

Aus der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und dem Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie
des Forschungsinstitutes für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
Dummerstorf

**Follikeldynamik und korrespondierende Hormonkonzentrationen beim Rind unter dem
Einfluss eines GnRH-Agonisten in Depotformulierung (Decapeptyl[®] Depot)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Tierärztin Annett Bellmann
aus Lauchhammer

Leipzig, 2001

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Gropp

Betreuer: Prof. Dr. Axel Sobiraj
PD Dr. habil. med.vet. Wilhelm Kanitz

Gutachter: Prof. Dr. Axel Sobiraj
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

PD Dr. habil. med.vet. Wilhelm Kanitz
Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie
des Forschungsinstitutes für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
Dummerstorf

Prof. Dr. Gotthold Gäbel
Veterinärphysiologisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Peter Sigfried Glatzel
Fachbereich Veterinärmedizin, Tierklinik für Fortpflanzung,
Freie Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 10.07.2001

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|--|----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Literaturübersicht | 2 |
| 2.1 Neuroendokrine Steuerung der Ovartätigkeit beim Rind | 2 |
| 2.1.1 GnRH | 2 |
| 2.1.2 GnRH-Rezeptor | 3 |
| 2.1.3 Liganden für den GnRH-Rezeptor | 5 |
| 2.1.4 Gonadotropine | 6 |
| 2.1.4.1 Rolle des FSH | 7 |
| 2.1.4.2 Rolle des LH | 9 |
| 2.1.4.3 Nichtsteroidale Regulatoren der Gonadotropinsekretion | 12 |
| 2.1.4.4 Vergleich des Sekretionsverhaltens von FSH und LH | 14 |
| 2.1.5 Gonadale Steroidhormone | 17 |
| 2.1.5.1 Estrogene | 17 |
| 2.1.5.2 Gestagene | 18 |
| 2.2 Follikeldynamik beim Rind unter physiologischen Bedingungen | 19 |
| 2.2.1 Numerische Aspekte | 19 |
| 2.2.2 Prozesse des Follikelwachstums | 19 |
| 2.2.3 Follikeldynamik und Gonadotropine | 27 |
| 2.2.3.1 Follikeldynamik und FSH | 27 |
| 2.2.3.2 Follikeldynamik und LH | 29 |
| 2.2.4 Follikeldynamik und Steroide | 30 |
| 2.2.4.1 Follikeldynamik und Estradiol | 30 |
| 2.2.4.2 Follikeldynamik und Progesteron | 32 |
| 2.3 Einsatz von GnRH und seinen Agonisten | 34 |
| 2.3.1 Wirkungsweise der GnRH-Agonisten | 35 |
| 2.4 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten | 36 |
| 2.4.1 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten und Follikelentwicklung | 37 |
| 2.4.2 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten und Gonadotropinsekretion | 38 |
| 2.4.3 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten und Steroidhormonsekretion | 39 |
| 2.4.4 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten und Reaktivität der Hypophyse | 40 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3 | Eigene Untersuchungen | 41 |
| 3.1 | Tiere, Material und Methoden | 41 |
| 3.1.1 | Tiermaterial und Tiervorbereitung | 41 |
| 3.1.2 | Katheterisierung und Blutentnahme | 41 |
| 3.1.3 | Ultraschalluntersuchung der Ovarien | 42 |
| 3.1.4 | Decapeptyl® Depot | 44 |
| 3.1.5 | Klinische Experimente | 45 |
| 3.1.5.1 | Untersuchungen zum endogenen bzw. induzierten LH-Gipfel und zum Ovulationsverhalten | 45 |
| 3.1.5.2 | Untersuchungen zur Follikeldynamik | 45 |
| 3.1.5.3 | Untersuchungen zur pulsatischen Gonadotropinsekretion | 45 |
| 3.1.5.4 | Untersuchungen zum Verlauf der Steroidhormonkonzentration | 46 |
| 3.1.6 | Quantitative Hormonanalysen | 48 |
| 3.1.6.1 | FSH | 48 |
| 3.1.6.2 | LH | 48 |
| 3.1.6.3 | Estradiol | 49 |
| 3.1.6.4 | Progesteron | 49 |
| 3.1.7 | Statistische Auswertungsverfahren | 49 |
| 3.1.7.1 | Auswertung der pulsatischen und basalen Gonadotropinkonzentrationen | 50 |
| 3.1.7.1.1 | Begriffsklärung | 50 |
| 3.1.7.1.2 | Pulsdetektionsprogramm PULSAR, 2.0 | 51 |
| 4 | Ergebnisse | 52 |
| 4.1 | Präovulatorische LH-Konzentrationen, Ovulationen und Follikeldynamik bei Kontroll- und Versuchstieren | 52 |
| 4.1.1 | Präovulatorische LH-Konzentrationen | 52 |
| 4.1.2 | Ovulationen zu Beginn der Versuchsperiode | 54 |
| 4.1.3 | Follikeldynamik | 54 |
| 4.1.3.1 | Follikeldynamik der Kontrolltiere | 55 |
| 4.1.3.2 | Follikeldynamik der Versuchstiere | 57 |
| 4.1.3.3 | Vergleich der Follikelzahlen der Kontroll- und Versuchstiere | 59 |
| 4.2 | Gonadotropinkonzentrationen | 62 |
| 4.2.1 | Pulsatile LH-Freisetzung | 62 |
| 4.2.1.1 | Anzahl der LH-Pulse | 63 |
| 4.2.1.2 | Amplituden der LH-Pulse und LH-Pulsflächen | 63 |
| 4.2.2 | Basale LH-Konzentration | 64 |
| 4.2.3 | Pulsatile FSH-Freisetzung | 65 |
| 4.2.3.1 | Anzahl der FSH-Pulse | 65 |
| 4.2.3.2 | Amplituden der FSH-Pulse und FSH-Pulsflächen | 66 |
| 4.2.4 | Basale FSH-Konzentrationen | 67 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.3 | Steroidhormonkonzentrationen | 69 |
| 4.3.1 | Progesteron (P_4) | 69 |
| 4.3.2 | Estradiol-17 β (E_2) | 71 |
| 4.3.2.1 | Estradiolkonzentration vor bzw. nach dem LH-Gipfel | 71 |
| 4.3.2.2 | Estradiolkonzentration im Verlauf des Zyklus | 72 |

| | | |
|----------|-------------------|-----------|
| 5 | Diskussion | 73 |
|----------|-------------------|-----------|

| | | |
|----------|------------------------|-----------|
| 6 | Zusammenfassung | 89 |
|----------|------------------------|-----------|

| | | |
|-----|---------|----|
| 6.1 | Summary | 91 |
|-----|---------|----|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Literaturverzeichnis | 93 |
|-----------------------------|-----------|

Anhang

Danksagung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|--|
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| DF1 _{max} | maximaler Durchmesser des dominanten Follikels der ersten Follikelreifungswelle |
| DF2 _{max} | maximaler Durchmesser des dominanten Follikels der zweiten Follikelreifungswelle |
| Def. | Definition |
| E ₂ | Estradiol-17β |
| ECLIA | Elektrochemilumineszenz-Immunoassay |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor) |
| FGF | Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor) |
| FSH | follikelstimulierendes Hormon |
| GnRH | Gonadotropin-Releasing Hormon |
| HDL | high density lipoprotein |
| HWZ | Halbwertszeit |
| IE | internationale Einheiten |
| IGF-I | insulinähnlicher Wachstumsfaktor I (insulin-like growth factor I) |
| IGF-II | insulinähnlicher Wachstumsfaktor II (insulin-like growth factor II) |
| IGF-BP | Bindungsprotein des insulinähnlichen Wachstumsfaktors |
| i.m. | intramuskulär |
| K | Kontrolltiere |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| LDL | low density lipoprotein |
| LH | luteinisierendes Hormon |
| LSM | LS-Mean, kleinster quadratischer Mittelwert (least square mean) |
| mg | Milligramm |
| μg | Mikrogramm |
| MHz | Megahertz |
| Mitarb. | Mitarbeiter |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid) |
| NaCl | Natriumchlorid |
| ng | Nanogramm |
| P ₄ | Progesteron |
| pg | Pikogramm |
| PGF _{2α} | Prostaglandin F2 alpha |
| RIA | Radioimmunoassay |
| SEM | Standardabweichung des Mittelwertes (standard error of the mean) |
| V | Versuchstiere |

1 EINLEITUNG

Bei den landwirtschaftlichen Nutztierarten Rind und Schwein sind Verfahren der Zyklussteuerung sehr bedeutsam für eine effiziente Produktion. Zunehmende Bedeutung erlangten zyklussteuernde Maßnahmen in den vergangenen Jahren auch bei den Zoo- und Wildtieren. Im letzten Jahrzehnt wurde eine Reihe von Verfahren zur Beeinflussung der Zykluslänge, des Ovulationszeitpunktes sowie der Anzahl der präovulatorischen Follikel entwickelt. In diesem Zusammenhang werden Biotechniken angewandt, welche die Leistungen von Zellen und Geweben der reproduktiven Organe auf unterschiedlichen Ebenen beeinflussen. Dabei erlangte der Einsatz von GnRH in Form analoger Verbindungen beim Rind eine besondere Bedeutung.

Konventionelle Einsatzgebiete des GnRH und seiner Analoga sind beispielsweise die Maßnahmen zur Brunst- und Ovulationssynchronisation, zur Erhöhung der Konzeptionsrate und zur Beeinflussung von Follikelzysten. Neue Aspekte der Anwendung ergaben sich durch die Steuerung der Ovarfunktion infolge einer Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten. Besondere Bedeutung erlangt die Applikation langzeitaktiver GnRH-Analoga beispielsweise bei gemeinsamer Haltung von männlichen und weiblichen Rindern und in der Ebermast. Die gezielte Anwendung des GnRH und seiner Agonisten in Langzeitformulierung setzt ein tiefgründiges Verständnis der GnRH-bedingten biologischen Wirkungen auf die endokrine Steuerung des Reproduktionsgeschehens voraus. Darüber hinaus gibt es bei der Anwendung verschiedener GnRH-Agonisten substanzbedingte Unterschiede bezüglich der Wirkungsausprägung: Aufgrund von Veränderungen der chemischen Struktur gegenüber dem nativen GnRH treten zwischen den einzelnen Substanzen zum Teil erhebliche Unterschiede in der Fähigkeit zur Stimulation der Freisetzung der Gonadotropine FSH und LH auf.

Im Hinblick auf den wiederholten Einsatz von GnRH-Agonisten oder den Einsatz von GnRH-Depot-Präparaten erlangten die Erkenntnisse über die pharmakodynamischen Wirkungen von GnRH unter den oben genannten Anwendungsbedingungen eine fundamentale Bedeutung. Das Sekretionsverhalten des GnRH aus dem Hypothalamus ist oft entscheidender als die Konzentration des Hormons im Hypophysen-Pfortader-Blut.

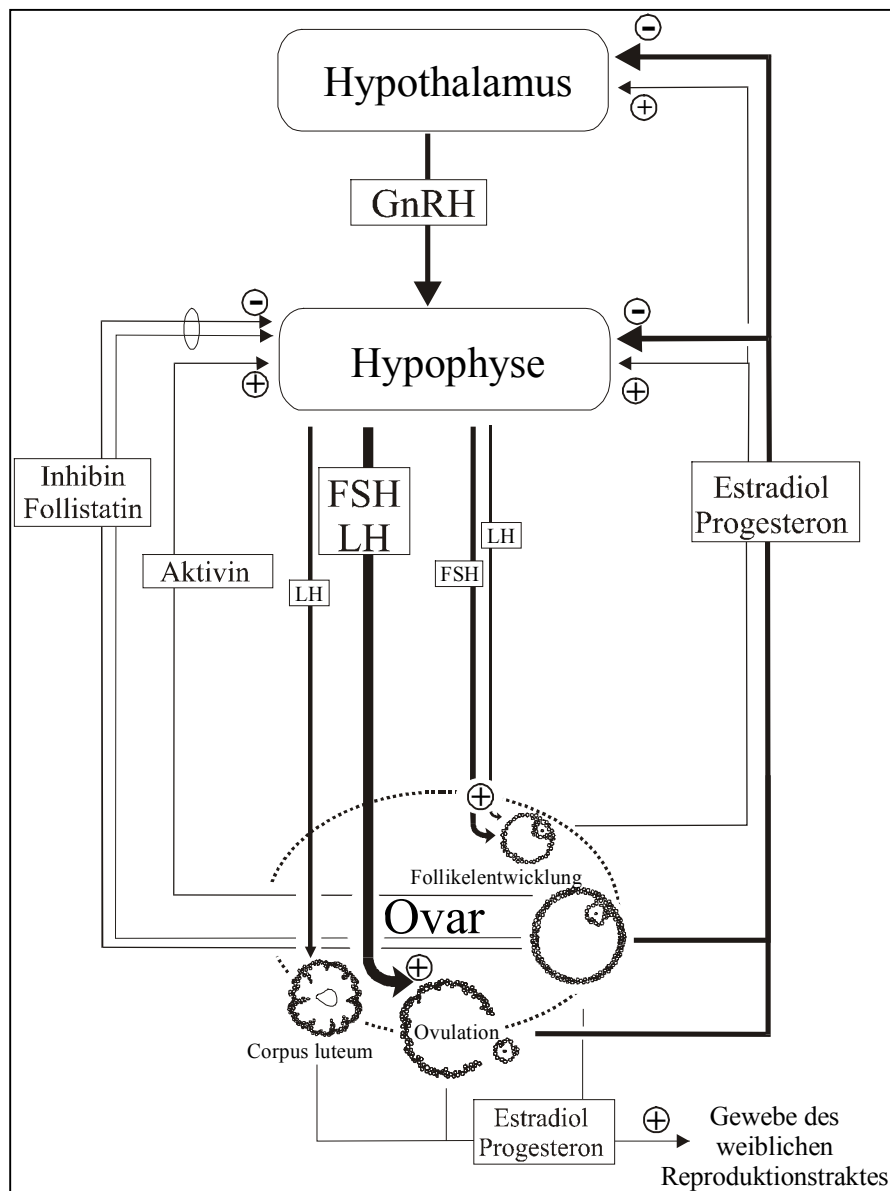
In der vorliegenden Arbeit wurde ein GnRH-Agonist in Depotformulierung an zyklische Jungrinder im präovulatorischen Zeitraum verabreicht. Nachfolgend wurden LH- und FSH-Sekretionsmuster, das Ovulationsverhalten, die Follikeldynamik, die Progesteron- sowie die Estradiolkonzentrationen analysiert. Die gewonnenen Daten wurden mit denen unbehandelter Kontrolltiere verglichen. Mit der Arbeit soll ein Beitrag zur Aufklärung der Bedeutung der Gonadotropine LH und FSH für die Follikeldynamik und die Corpus luteum-Funktion beim Rind geleistet werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Neuroendokrine Steuerung der Ovartätigkeit beim Rind

2.1.1 GnRH

Im Säugetier-Gehirn wird ein spezifisches Neurohormon gebildet, das auf die Adenohypophyse einwirkt und deren gonadotrope Hormonsekretion reguliert. Dieses erstmals von MCCANN und Mitarb. (1960) nachgewiesene Hormon wird als Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH, LRH) bzw. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) oder auch als Luliberin bezeichnet, da es vor allem die LH-, in geringerem Maße auch die FSH-Synthese und -Sekretion der Hypophyse steuert. Die Isolierung und Charakterisierung des GnRH erfolgte 1971 durch zwei unabhängig voneinander arbeitende Gruppen (BURGUS und Mitarb., 1971; MATSUO und Mitarb., 1971). Das GnRH ist ein Dekapeptid mit folgender Aminosäuresequenz: (pyro)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. Seine Synthese erfolgt in den Neuronen des rostralen und mediobasalen Hypothalamus (Area praeoptica und Nucleus arcuatus), es wurde jedoch auch in extrahypothalamischen Hirngebieten gefunden (LESHIN und Mitarb., 1988; SILVERMAN, 1988). Unter physiologischen Bedingungen wird das GnRH pulsatil (episodisch) ausgeschüttet. Diese pulsatile Sekretion ist Voraussetzung für eine physiologische Gonadotropinsekretion (CONN und CROWLEY, 1991). Als Ursprungsort der Episodik ist der mediobasale Hypothalamus anzusehen, in dem zumindest für das GnRH ein Pulsgenerator lokalisiert zu sein scheint (LINCOLN und Mitarb., 1985). Über das Hypophysenpförtadensystem wird das GnRH zum Hypophysenvorderlappen transportiert und bindet dort mit hoher Affinität an spezifischen Rezeptoren. Das originäre GnRH hat nur eine sehr kurze Wirkungsdauer (KIESEL und RUNNEBAUM, 1992; DÖCKE, 1994). Die Ausscheidung des GnRH erfolgt in zwei Phasen: Die erste Phase (Verteilungsphase) entspricht einer biologischen Halbwertszeit von 2 bis 4 Minuten (HANDELSMAN und SWERDLOFF, 1986), die zweite (Eliminationsphase) einer solchen von etwa 20 Minuten. Die Regulation des GnRH erfolgt zu einem großen Teil durch die Ovarsterioide Estradiol und Progesteron. Diese wirken synergistisch auf den hypothalamischen GnRH-Pulsgenerator (MARTIN und MITARB., 1988). Nach Untersuchungen am Schaf (KARSCH und Mitarb., 1997), wird GnRH in der Lutealphase, während die Menge des zirkulierenden Progesterons hoch und die des Estradiols relativ gering ist, in niederfrequenten Pulsen sezerniert. In der Mitte der folliculären Phase, wenn die Progesteronkonzentration fällt und die des Estradiols steigt, erhöht sich die GnRH-Pulsfrequenz und die Amplitude sinkt. Dies sind unabdingbare Voraussetzungen für einen GnRH-Anstieg, der den präovulatorischen LH-Gipfel bedingt. Neben der indirekten Wirkungsvermittlung des GnRH über die Beeinflussung der Gonadotropinsekretion (CHENAULT und Mitarb., 1990), wird beispielsweise beim Menschen auch eine direkte Beeinflussung der reproduktiven Gewebe diskutiert (HSUEH und JONES, 1981). Bei landwirtschaftlichen Nutztieren konnten im Ovar bisher keine GnRH-Rezeptoren nachgewiesen werden (BROWN und REEVES, 1983; IRELAND und Mitarb., 1990). Die Abbildung 1 zeigt das Regulationsschema der Achse Hypothalamus-Hypophyse-Ovar.

**Abbildung 1.**

Schematische Darstellung von Interaktionen zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Ovar (modifiziert nach CARR, 1992).

Die physiologische Kontrolle der Gonadotropinsekretion erfolgt durch das GnRH. Die Rückkopplungsmechanismen wirken sowohl auf der Ebene des Hypothalamus als auch auf der Ebene der Hypophyse. Die Gonadotropine greifen ebenfalls am Hypothalamus an und regulieren ihre eigene Sekretion (kurzer Rückkopplungsmechanismus) und auch das GnRH beeinflusst seine eigene Sekretion (ultrakurzer Rückkopplungsmechanismus).

2.1.2 GnRH-Rezeptor

Zur Wirkungsvermittlung bindet das Dekapeptid GnRH an seinen Rezeptor. Dieser ist membranständig und hat sieben transmembrane Domänen. Die Wirkung des GnRH wird über Guanylnucleotidbindungsproteine (G-Proteine) vermittelt. Das G-Protein wird nach der Bindung des GnRH an seinen Rezeptor aktiviert und ruft die Stimulation der Phospholipase C hervor. Diese hydrolysiert Phosphatidylinositolbiphosphat zu Diacylglycerol und Inositoltriphosphat. Diacylglycerol und Inositoltriphosphat sind, ebenso wie das durch die Bindung intrazellulär angereicherte Kalzium, als second messenger wirksam. Diacylglycerol aktiviert die kalziumabhängige Proteinkinase C, welche die Synthese und Freisetzung (Exozytose) der Gonadotropine FSH und LH bewirkt (CONN und CROWLEY, 1991; HAWES und Mitarb., 1992).

Die GnRH-Rezeptoren sind gleichmäßig auf der Oberfläche der Hypophysenzellen verteilt. Ihre Regulation ist sehr komplex und erfolgt durch Estrogene, Progesteron, Testosteron und

Inhibin sowie durch den eigenen Liganden, das GnRH (CLAYTON und CATT, 1981; SAVOY-MOORE und Mitarb., 1980; MARIAN und Mitarb., 1981; LAWS und Mitarb., 1990; SEALFON und Mitarb., 1990; GREGG und Mitarb., 1991; DÖCKE, 1994). Die Rezeptorkonzentration nimmt durch eine Testosteron- und Progesteronbehandlung ab, durch eine Estradiolbehandlung jedoch zu (CLAYTON, 1988; GREGG und NETT, 1989). Die pulsatile Freisetzung geringer Mengen GnRH bewirkt eine Erhöhung der Anzahl der GnRH-Rezeptoren (Up-Regulation), während eine kontinuierliche Freisetzung höherer Mengen sowohl eine Verringerung der Anzahl der GnRH-Rezeptoren (Down-Regulation) als auch eine Verringerung der Reaktivität (Desensibilisierung) der gonadotropen Zellen der Hypophyse hervorruft (LOUMAYE und CATT, 1982; KATT und Mitarb., 1985; CONN und CROWLEY, 1991). Desweiteren wurde eine Verringerung der Reaktivität der Hypophyse bereits während des Auftretens des endogenen GnRH-Gipfels beschrieben (WEISS und Mitarb., 1995; CASSINA und NEILL, 1996). Die zellulären Mechanismen, die dabei eine Bedeutung haben, sind noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise wird die Anzahl der GnRH-Rezeptoren posttranslational durch Recycling, Modifikation oder Degradation reguliert (KAISER und Mitarb., 1993). In der Tabelle 1 finden sich einige Angaben zu hormonell bedingten Veränderungen der GnRH-Rezeptorkonzentration.

Tabelle 1. Kontrolle der Rezeptorbildung und Beziehungen zwischen der Anzahl der hypophysären GnRH-Rezeptoren und der Gonadotropinsekretion bei der Ratte in verschiedenen physiologischen Situationen bzw. infolge der Einwirkung von Hormonen (CLAYTON, 1989)

| Maßnahme / Ereignis | GnRH-Rezeptorkonzentrationsänderung | Konzentrationsveränderung der Serumgonadotropine |
|-------------------------------|-------------------------------------|--|
| Ovarzyklus | ↑ 2 x vor LH-Gipfel | ↑ 10 x bei LH-Gipfel |
| Laktation, Hyperprolaktinämie | ↓ 50 % | ↓ 50 % |
| Gonadektomie | ↑ 2-3 x | ↑ 10 x |
| Exogenes Estrogen | ↓ , dann ↑ 2 x nach 48 h | ↑ bei LH-Gipfel |
| GnRH pulsatil | ↑ 2-3 x | ↑ 2 x |
| GnRH kontinuierlich | ↓ 40-60 % | ↓ 80-90 % |

Nach der Bindung eines GnRH-Moleküls an seinen Rezeptor wird der GnRH-Rezeptorkomplex in die Zelle aufgenommen und abgebaut. Diese Internalisierung kann sowohl für GnRH-Agonisten als auch für GnRH-Antagonisten erfolgen (HAZUM und Mitarb., 1980). Prätranslational könnte die Regulation auf der Ebene der Genexpression und damit der Biosynthese des Rezeptors erfolgen (KAISER und Mitarb., 1993). Die Regulation der GnRH-Rezeptor-mRNA wird ebenfalls durch Estrogene, Progesteron und Inhibin sowie vom GnRH selbst beeinflusst (SEALFON und Mitarb., 1990; WU und Mitarb., 1994). Estradiol und/oder Inhibin und die pulsatile Freisetzung des GnRH steigern den Gehalt an mRNA für den GnRH-Rezeptor oviner Hypophysenzellen, während Progesteron den mRNA-Gehalt senkt (WU und Mitarb., 1994; TURZILLO und Mitarb., 1995). Gonadektomie bewirkt ein Ansteigen der mRNA für den GnRH-Rezeptor (KAISER und Mitarb., 1993). Bei kastrierten männlichen Schafen wurde durch die Gabe eines GnRH-Agonisten über sieben Tage der Gehalt an GnRH-Rezeptor-mRNA um 84-89 % gesenkt (WU und Mitarb., 1994).

Die Behandlung mit Estradiol bewirkt bei ovariectomierten weiblichen Schafen, die einer chronischen GnRH-Applikation unterzogen wurden, neben der Erhöhung des Gehaltes an mRNA für den GnRH-Rezeptor auch die Steigerung der Anzahl der GnRH-Rezeptoren. Estradiol ist demzufolge in der Lage, dem negativen Einfluss des GnRH (homologe Desensibilisierung) durch die Stimulation der GnRH-Rezeptor-mRNA und der GnRH-Rezeptorkonzentration entgegenzuwirken (TURZILLO und Mitarb., 1998).

Nach Einwirkung des GnRH auf die gonadotropen Zellen nimmt die Wirkungsausprägung unterschiedlich lange Zeit in Anspruch. Während eine Gonadotropinausschüttung bereits innerhalb weniger Minuten feststellbar ist, erfordert die Stimulation der Biosynthese der Gonadotropine und der GnRH-Rezeptoren einige Stunden, und bis zur Zunahme der Anzahl der gonadotropen Zellen und der Größe des sekretorischen Apparates dauert es Tage bis Wochen (CLAYTON, 1989). In der neueren Literatur gibt es keine quantitativen Angaben zur Konzentration der hypophysären GnRH-Rezeptoren. NETT und Mitarb. (1987) fanden an den Zyklustagen 6, 12 und 18 GnRH-Rezeptorkonzentrationen von über 1 pmol pro Hypophyse. An den Zyklustagen 19, 20 und 21 war die Konzentration der hypophysären GnRH-Rezeptoren auf Werte unter 0,4 pmol gesunken.

2.1.3 Liganden für den GnRH-Rezeptor

Neben dem natürlichen GnRH können weitere Substanzen, die auch als GnRH-Analoga bezeichnet werden, am GnRH-Rezeptor binden. Diese Substanzen sind synthetische Non- und Dekapeptide, die sich durch den Ersatz einer oder mehrerer Aminosäuren gegenüber dem nativen GnRH auszeichnen. Dabei sind Agonisten und Antagonisten von Bedeutung. Agonisten bewirken initial einen GnRH-ähnlichen Reaktionsverlauf, während Antagonisten am Rezeptor binden, jedoch keine metabolischen oder zellulären Veränderungen bewirken. Antagonisten hemmen die Bindung des natürlichen Liganden kompetitiv (HAZUM und CONN, 1989; CONN und CROWLEY, 1991). Da in der eigenen Arbeit die Wirkung eines Agonisten untersucht wurde, wird im folgenden nicht näher auf GnRH-Antagonisten eingegangen.

Beim originären GnRH sind die Aminosäuren in den Positionen zwei und drei für die Gonadotropinfreisetzung bedeutsam, während die Positionen eins, sechs und zehn für die Aufrechterhaltung der räumlichen Struktur und für die Bindung am Rezeptor benötigt werden (CLAYTON und CATT; 1981). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Agonisten mit veränderter Aminosäuresequenz synthetisiert. Diese Verbindungen unterscheiden sich vom natürlichen GnRH vor allem durch Modifikationen der Aminosäuresequenz in den Positionen sechs und zehn. Dadurch haben diese Verbindungen zum Teil eine verstärkte und/oder prolongierte Wirkung. Im Blut und in den Geweben vorkommende Peptidasen bewirken die Inaktivierung des natürlichen GnRH hauptsächlich durch eine schnell eintretende Aufspaltung zwischen Gly⁶ und Leu⁷ und durch eine langsamere Abtrennung des C-terminalen Dipeptides Pro-Gly-NH₂. Deshalb wurden anstelle der L-Aminosäure Glycin in Position sechs D-Aminosäuren eingeführt, um auf diesem Wege eine Verzögerung der Wirkung der Peptidasen zu erreichen. Zusätzlich wurden bei einigen Agonisten Veränderungen in Position neun und zehn vorgenommen.

Diese Modifikation haben sich hinsichtlich einer Verlängerung der Wirkung besonders bewährt, und es konnte so eine Steigerung der Wirksamkeit auf das 50-bis 200-fache erreicht werden (CONN und CROWLEY, 1991; DÖCKE, 1994). In Abhängigkeit von der chemischen Struktur der Agonisten bestehen wesentliche Unterschiede in der Potenz zur Freisetzung der Gonadotropine (CHENAULT und Mitarb., 1990). Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über Bezeichnung und Formeln des nativen GnRH und gebräuchlicher GnRH-Agonisten.

Tabelle 2. Strukturformeln des originären GnRH und einiger GnRH-Agonisten.

| Bezeichnung | Formel | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----------------------|-----|-----|---------------|---------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| natives GnRH | p Glu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Arg | Pro | Gly-NH ₂ |
| Triptorelin | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D-Trp | 7 | 8 | 9 | 10 |
| D-Phe ⁶ -LHRH | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D-Phe | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Nafarelin | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D-(Nal ₂) | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Goserelin | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D-Ser(t-Bu) | 7 | 8 | 9 | AzGly |
| Buserelin* | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D-Ser(t-Bu) | 7 | 8 | 9 - Äthylamid | |
| Leuprorelin* | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D-Leu | 7 | 8 | 9 - Äthylamid | |
| Deslorelin* | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | D-Trp | 7 | 8 | 9 - Äthylamid | |

Die Zahlen in den einzelnen Positionen der Strukturformeln der Agonisten symbolisieren Übereinstimmung mit dem nativen GnRH. *Gekennzeichnete Agonisten stellen Nonapeptide dar.

2.1.4 Gonadotropine

Die hypophysären Gonadotropine FSH und LH haben herausragende Bedeutung bei der Regulation der ovarphysiologischen Prozesse. Beide Substanzen sind Glykoproteinhormone, die sich aus einem Kohlenhydratanteil, der beim Rind etwa 13-16 % der Molekülmasse ausmacht, und zwei nicht kovalent verbundenen Proteinketten zusammensetzen. Diese Proteinketten werden als α - und β -Untereinheit bezeichnet. Die α -Untereinheit aller Glykoproteinhormone einer Spezies ist das Produkt eines einzelnen Genes mit einer Sequenz von 90-96 Aminosäuren. Wahrscheinlich wird zunächst von der fetalen Hypophyse nur die gemeinsame α -Untereinheit produziert. Diese ist auch später stets im Überschuss vorhanden und wird allein sezerniert. Die β -Untereinheit ist hormonspezifisch konfiguriert und determiniert dadurch die biologische Wirkung des Hormons. Im Gegensatz zur α -Untereinheit tritt die β -Untereinheit nicht in freier Form auf. Die Synthese der vollständigen Hormone FSH und LH erfolgt in den Zellen des Hypophysenvorderlappens unter der Einwirkung und Regulation des GnRH. Auch deren Sekretion wird durch das GnRH reguliert (DÖCKE, 1994). Die gonadotropen Zellen sind dabei besonders sensitiv gegenüber der Pulsfrequenz, mit der das GnRH freigesetzt wird. Die Signaltransduktionsvorgänge, die bei der Freisetzung der Gonadotropine eine Rolle spielen, sind noch nicht hinreichend geklärt. Nach GnRH-Einwirkung wird die Transkriptionsaktivität des Genes für die α -Untereinheit vor allem durch kalziumabhängige Transduktionswege stimuliert.

Demgegenüber werden die Gene für die β -Untereinheiten hauptsächlich über Proteinkinase-C-abhängige Signaltransduktionsprozesse reguliert (SAUNDERS und Mitarb., 1998). Die Reaktivität der gonadotropen Zellen auf GnRH variiert und ist vor allem abhängig vom hormonellen Milieu (CLAYTON und CATT, 1981). Sie korreliert, zumindest teilweise, mit der Anzahl der GnRH-Rezeptoren (SAVOY-MOORE und Mitarb., 1980; MARIAN, 1981). In der Tabelle 3 sind die wichtigsten Wirkungen von FSH und LH auf die weibliche Keimdrüse, die teilweise unter Vermittlung gonadaler Steroide und Peptide ausgeübt werden, zusammengefasst.

Tabelle 3. Wirkungen von FSH und LH auf das Ovar

| Gonadotropin | Wirkungsort | Wirkung |
|--------------|--|--|
| FSH | follikuläre Granulosazellen | Proliferation und Reifung der Granulosazellen, Aromatisierung von Androgenen zu Estrogenen, Induktion der LH-Rezeptoren und der durch LH stimulierbaren Adenylatzyklase, Förderung der Eizellreifung |
| LH | Theka-interna-Zellen, Granulosazellen im präovulatorischen Follikel und im Corpus luteum | Biosynthese und Sekretion von Androgenen, Follikelreifung und Ovulation, Bildung, Erhaltung und Progesteronsekretion des Corpus luteum (Luteinisierung der Granulosazellen) |

2.1.4.1 Rolle des FSH

Das FSH ist als Schlüsselhormon für den Beginn einer Follikelreifungswelle anzusehen. Es spielt bei der Kontrolle der Follikelentwicklung eine herausragende Rolle. Beispielsweise wurde bei hypogonadotropen Schafen gezeigt, dass FSH allein das Wachstum von Follikeln zu präovulatorischer Größe stimulieren kann, während LH dazu allein nicht in der Lage ist (PICTON und Mitarb., 1990a, 1990b).

PADMANABHAN und Mitarb. (1997) postulierten eine **basale und eine episodische (pulsatile) FSH-Sekretion**. Beide Sekretionsarten werden durch unterschiedliche Komponenten reguliert (MCNEILLY, 1988; FARNWORTH, 1995; PADMANABHAN und Mitarb., 1997). Die Prüfung dieser Hypothese ist jedoch aufgrund des Sekretionsverhaltens und der langen Halbwertszeit des zirkulierenden FSH (Tabelle 6) sehr schwierig. Die episodische FSH-Sekretion lässt sich wiederum in eine GnRH-abhängige und eine GnRH-unabhängige Komponente gliedern (PADMANABHAN und Mitarb., 1997). Die Autoren fanden Anhaltspunkte dafür, dass der hauptsächliche Sekretionsmodus beim FSH, im Gegensatz zum LH, der basale oder tonische ist. Unterstützende Argumente für eine GnRH-vermittelte episodische FSH-Sekretion konnten aus Perfusionsuntersuchungen gewonnen

werden, in denen die FSH-Konzentrationen die pulsatile Sekretion des verabreichten GnRH widerspiegeln (PADMANABHAN und Mitarb., 1997). Bei ovariectomierten Schafen wurde eine enge Beziehung zwischen GnRH- und FSH-Pulsen nachgewiesen, was ebenfalls für eine GnRH-vermittelte Regulation der episodischen Sekretion spricht. Die Untersuchung der Entropie von FSH und LH (ohne Identifikation einzelner Pulse) beim Schaf und Menschen ergab, dass FSH unregelmäßiger als LH sezerniert wird. Letztgenannte Ergebnisse liefern einen weiteren Hinweis dafür, dass die FSH-Sekretion von GnRH und einem FSH-Releasing Faktor beeinflusst wird, während die LH-Sekretion nur durch GnRH kontrolliert wird (PINCUS und Mitarb., 1998). Die Regulation der Sekretion des FSH aus der Hypophyse wird bei Rindern neben dem GnRH und den Steroiden vermutlich durch ein Zusammenwirken von Faktoren, zu denen Inhibin, Aktivin und Follistatin gehören, kontrolliert (IGARASHI, 1988; KOGAWA und Mitarb. 1991; BESECKE und Mitarb., 1996; EVANS und Mitarb., 1997; KANEKO und Mitarb., 1997; SZABO und Mitarb., 1998). Diese komplexe Regulation könnte das Ausbleiben einer umgehenden FSH-Ausschüttung auf die Injektion von GnRH erklären (ASPDEN und Mitarb., 1996).

Es wird davon ausgegangen, dass die vom dominanten Follikel gebildeten Steroide einen negativen Feedback-Effekt auf die FSH-Konzentration ausüben. So wurden zwischen den Zyklustagen 1 und 2 sowie 9 und 10 hohe FSH-Werte beobachtet, während sie zwischen den Tagen 3 und 7 und nach dem Tag 12 signifikant geringer waren. Die Estradiolkonzentrationen verhielten sich dazu invers (EVANS und Mitarb., 1997).

Es gibt nur wenige Arbeiten, die sich mit der Pulsatilität der FSH-Sekretion während des Zyklus beim Rind befassen. Auch herrscht noch immer Uneinigkeit darüber, ob die Sekretion von FSH überhaupt als episodisch oder pulsatil bezeichnet werden sollte (PADMANABHAN und Mitarb., 1994; ROCHE und Mitarb., 1996). Einige Autoren beschreiben das Auftreten einer pulsatilen FSH-Sekretion (IRELAND und ROCHE, 1982a; WALTERS und Mitarb., 1984; PADMANABHAN und Mitarb., 1994; FINNERTY und Mitarb., 1998), während andere Autoren dies nicht bestätigt haben (CUPP und Mitarb., 1995; GINTHER und Mitarb., 1998). Die Identifizierung und Charakterisierung einzelner FSH-Pulse ist aufgrund der langen Halbwertszeit äußerst kompliziert. Hinzu kommt die Tatsache, dass offenbar FSH-Isoformen mit unterschiedlichen Halbwertszeiten sezerniert werden: Während eines Pulses treten FSH-Isoformen mit kürzerer Halbwertszeit als zwischen den Pulsen auf (PADMANABHAN und Mitarb., 1997).

Beim weiblichen Rind wurde eine Übereinstimmung der FSH- Pulsfrequenz mit der Frequenz der Sekretion des LH in der frühen Lutealphase (WALTERS und SCHALLENBERGER, 1984; SCHALLENBERGER und Mitarb., 1985a) beschrieben. Auch beim Bullen (FINNERTY und Mitarb., 1998) und beim Büffel (SINGH und Mitarb., 1998) treten LH- und FSH-Pulse synchron auf. In jüngeren Studien wurde während des Zyklus beim Rind keine Pulsatilität der FSH-Ausschüttung festgestellt (CUPP und Mitarb., 1995; GINTHER und Mitarb., 1998). RHODES und Mitarb. (1995) fanden nur geringe Hinweise für ein Vorhandensein pulsatiler FSH-Sekretion. In 8 von 15 untersuchten Zeiträumen traten keine FSH-Pulse auf. Inwieweit ein Teil der gefundenen FSH-Pulse (SCHALLENBERGER und Mitarb., 1985a) auf Kreuzreaktionen mit LH bei der Bestimmung zurückzuführen sind, kann nicht ausreichend geklärt werden (RHODES und Mitarb., 1995). In der Tabelle 4 sind Angaben verschiedener Autoren zur FSH-Pulsatilität beim Rind zusammengefasst.

Tabelle 4. Literaturangaben zur pulsatilen FSH-Sekretion

| Autor | Methode der Pulsdetektion/ Pulsdefinition | Zeitpunkt* | FSH-Pulsfrequenz (Originalangaben) | FSH-Pulsanzahl/ 6 Stunden |
|------------------------------------|--|---|---|--|
| WALTERS und Mitarb., 1984 | Der Wert, der einen vorhergehenden (Basal-) Wert um mindestens das Vierfache des Intra-assay-Variationskoeffizienten übersteigt, wird als Puls bezeichnet. | frühe Lutealphase (Tag 4) mittlere Lutealphase (Tag 11) | 8,5 / 12 h 6,3 / 12 h | 4,2 3,2 |
| WALTERS und SCHALLEN-BERGER, 1984 | s. WALTERS und Mitarb., 1984 | unmittelbar vor LH-Gipfel | Interpulsintervall von 40 ± 0,5 min | 9,0 |
| SCHALLEN-BERGER und Mitarb., 1985b | s. WALTERS und Mitarb., 1984 | während der Trächtigkeit | 5,0 bis 6,2 / 12 h | 2,5 bis 3,1 |
| SCHALLEN-BERGER, 1990 | s. WALTERS und Mitarb., 1984 | Tag 1-4 Tag 5-8 Tag 9-12 Tag 13-16 Tag 17-19 Tag 20-21 | 7,4 / 12 h 7,2 / 12 h 7,0 / 12 h 6,5 / 12 h 6,3 / 12 h 10,7 / 12 h | 3,7 3,6 3,5 3,2 3,2 5,4 |
| MEE und Mitarb., 1993 | Def. von SKAGGS ^x und Mitarb., 1986, PULSAR-Programm | Tag 1 Tag 3 Tag 8 | 0 / 8 h 0,1 / 8 h 1,0 / 8 h | 0 0,1 0,8 |
| RHODES und Mitarb., 1995 | PULSAR-Programm (MERRIAM und WACHTER, 1982) | Tag 2-3 Tag 5-6 Tag 8-9 | 0,03 / h 0,06 / h 0,03 / h 8 von 15 Intervallen ohne FSH-Pulse | 0,2 0,4 0,2 |

*Angaben der Autoren zur Definition des Zyklusbeginns sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

^x Die Pulsdefinition von SKAGGS beinhaltet folgende Kriterien: 1) die höchste erreichte Konzentration liegt mindestens 50 % über dem vorangegangenen niedrigen Wert, 2) mindestens zwei aufeinanderfolgende Werte liegen zwischen dem Pulswert und dem niedrigsten Wert und 3) der Grad des Abfalles der Konzentration vom höchsten zum niedrigsten Wert ist nicht größer als die Halbwertszeit des Hormones.

Die aufgeführten Werte lassen vermuten, dass die FSH-Pulsanzahl neben methodischen Einflussfaktoren auch vom Zyklusstadium abhängig sein könnte. Während der Lutealphase ist die Anzahl der FSH-Pulse relativ konstant. Im präovulatorischen Zeitraum erfolgt eine Erhöhung der FSH-Pulsanzahl.

2.1.4.2 Rolle des LH

Im weiblichen Organismus besitzt das LH eine große Bedeutung bei der Follikelreifung, der Ovulation und der Ausprägung und Funktion des Corpus luteum. Obwohl dem LH primär steroidogene Eigenschaften zugesprochen werden, ist es auch bedeutsam für die Entwicklung der Antralfollikel. LH allein kann die Follikelentwicklung nicht stimulieren, jedoch können

LH-Pulse mit hoher Amplitude in Abhängigkeit von der FSH-Stimulation die Follikelentwicklung teilweise hemmen. Wird die LH-Wirkung komplett durch passive Immunisierung unterdrückt, kommt es ebenfalls zur Hemmung der FSH-stimulierten Follikelentwicklung (MCNEILLY und Mitarb., 1991).

Besonders wichtig ist das LH bei der finalen Entwicklung dominanter Follikel. So ist beim Schaf die Entwicklung des dominanten zum ovulatorischen Follikel abhängig von der Frequenzsteigerung der pulsatischen LH-Sekretion (BAIRD und MCNEILLY, 1981). Der dominante Follikel ist in der Lage, seine Ansprüche an das ihn umgebene Gonadotropinmilieu von FSH auf LH zu verlagern, wenn das LH in hochfrequenten Pulsen mit niedriger Amplitude freigesetzt wird (CAMPBELL und Mitarb., 1995). Die massive Ausschüttung von LH bewirkt letztendlich die Ovulation des oder der dazu kompetenten Follikel.

Die **LH-Sekretion** erfolgt in diskreten Pulsen. Man kann daher zwischen einer pulsatischen und einer basalen LH-Sekretion unterscheiden. Die LH-Pulsatilität verändert sich in Abhängigkeit vom Zyklusstadium des Tieres (WALTERS und SCHALLENBERGER, 1984; SCHALLENBERGER und Mitarb., 1985a; EVANS und Mitarb., 1997). Frequenz und Amplitude der LH-Pulse sind abhängig von der Funktion des Corpus luteum. Es besteht eine inverse Beziehung zwischen den Progesteron- und LH-Konzentrationen beim Rind. Niedrige Progesteronkonzentrationen begünstigen eine Erhöhung der LH-Pulsfrequenz (ROCHE und IRELAND, 1981; IRELAND und ROCHE, 1982a) und des LH-Basalniveaus (INSKEEP und Mitarb., 1996). Hohe Progesteronkonzentrationen verursachen eine Reduktion der LH-Pulsfrequenz auf einen Puls pro 3-4 Stunden (RAHE und Mitarb., 1980; WALTERS und Mitarb., 1984; RHODES und Mitarb., 1995) bei steigender Amplitude (RAHE und Mitarb., 1980). Diese hormonellen Veränderungen beeinflussen die weitere Entwicklung eines dominanten Follikels. Dieser verliert bei geringer Frequenz der LH-Pulse seine Dominanz und es kommt unter einem erneuten FSH-Anstieg zum Auftreten einer neuen Follikelreifungswelle. Fand jedoch die Luteolyse statt, erfolgt eine Erhöhung des LH-Basalniveaus, und die LH-Pulsfrequenz steigt wieder auf einen Puls pro Stunde. Der dominante Follikel wird dadurch zu maximaler Estrogensynthese angeregt, und daraufhin erfolgt der präovulatorische LH-Gipfel (KESNER und Mitarb., 1981; IRELAND und ROCHE, 1982a; WALTERS und SCHALLENBERGER, 1984; MIHM und Mitarb., 1996).

EVANS und Mitarb. (1997) sehen im Anstieg der LH-Amplitude in der frühen bis mittleren Lutealphase eine wichtige Voraussetzung für die finale Entwicklung eines dominanten Follikels. Zum Zeitpunkt der Wachstums- und Entwicklungsdifferenzierung liegen erhöhte LH-Konzentrationen vor (GINTHER und Mitarb., 1998). Wird die pulsatile LH-Sekretion jedoch unterdrückt, so kommt es zur Stagnation des Wachstums großer Follikel bei einem Durchmesser von 7 bis 9 mm (GONG und Mitarb., 1995).

Die präovulatorische Reifung der Follikel ist eng mit dem Anstieg der LH-Rezeptoren auf Granulosazellen und der damit einhergehenden erhöhten Sensitivität gegenüber dem zirkulierenden LH verbunden. Verschiedene Studien belegen, dass die Konzentrationen der LH-Rezeptoren auf den Granulosazellen großer (präovulatorischer) Follikel im Zeitraum weniger Stunden bis zum Maximum des präovulatorischen LH-Gipfels erheblich ansteigt (IRELAND und ROCHE, 1982b, 1983b).

Die Konzentration der LH-Rezeptoren auf Granulosazellen von Follikeln über 6 mm ist in der Lutealphase gering. Lediglich am Tag sieben ist eine kurzzeitige Erhöhung der LH-Rezeptoranzahl beobachtet worden (IRELAND und ROCHE, 1983a). Die Autoren vermuten, dass dieser Anstieg mit der Entwicklung eines potentiell ovulationskompetenten Follikels einhergeht, welcher jedoch nach Tag sieben atretisch wird. Untersuchungen von BODENSTEINER und Mitarb. (1996), BAO und Mitarb. (1997) sowie BEG und Mitarb. (2001) zeigen, dass die Expression der mRNA für LH-Rezeptoren in Granulosazellen von Follikeln > 8 mm eine entscheidende Rolle für die Erlangung der Dominanz eines Follikels spielt.

Tabelle 5. Literaturangaben zur pulsatilen LH-Sekretion

| Autor | Methode der Pulsdetektion/ Pulsdefinition | Zeitpunkt* | LH-Pulsfrequenz (Originalangaben) | LH-Pulsanzahl/ 6 Stunden |
|-----------------------------------|--|---|---|--|
| RAHE und Mitarb., 1980 | Zeitreihen-Methode | frühe Lutealphase (Tag 3 oder 4 nach Östrus) mittlere Lutealphase (Tag 10 oder 11 nach Östrus) | 20-30 / 24 h 6 / 24 h | 5,0 bis 7,5 1,5 |
| WALTERS und Mitarb., 1984 | Der Wert, der einen vorhergehenden (Basal-) Wert um mindestens das Vierfache der Standardabweichung des Assays übersteigt, wird als Puls bezeichnet. | frühe Lutealphase (Tag 4) mittlere Lutealphase (Tag 11) | 8 / 12 h 3,6 / 12 h | 4,0 1,8 |
| WALTERS und SCHALLENBERGER, 1984 | s. WALTERS und Mitarb., 1984 | unmittelbar vor LH-Gipfel | Interpulsintervall von 40 ± 0,5 min | 9,0 |
| SCHALLENBERGER und Mitarb., 1985b | s. WALTERS und Mitarb., 1984 | während der Trächtigkeit | 0,4 bis 2,7 / 12 h | 0,2 bis 1,4 |
| SCHALLENBERGER, 1990 | s. WALTERS und Mitarb., 1984 | Tag 1-4 Tag 5-8 Tag 9-12 Tag 13-16 Tag 17-19 Tag 20-21 | 7,0 / 12 h 3,2 / 12 h 3,5 / 12 h 3,5 / 12 h 4,3 / 12 h 13,3 / 12 h | 3,5 1,6 1,8 1,8 2,2 6,2 |
| MEE und Mitarb., 1993 | Def. von SKAGGS und Mitarb., 1986, PULSAR-Programm (MERRIAM und WACHTER, 1982) | Tag 1 Tag 3 Tag 8 | 0 / 8 h 1,8 / 8 h 1,3 / 8 h | 0 1,4 1 |
| PETERS und Mitarb., 1994 | PULSAR-Programm (MERRIAM und WACHTER, 1982) | Tag 2 Tag 7 Tag 12 Tag 17 | 13,4 / 24 h 7,6 / 24 h 6,2 / 24 h 11,2 / 24 h | 3,4 1,9 1,6 2,8 |
| RHODES und Mitarb., 1995 | PULSAR-Programm (MERRIAM und WACHTER, 1982) | Tag 2-3 Tag 5-6 Tag 8 | 0,41 / h 0,23 / h 0,28 / h | 2,5 1,4 1,7 |

Fortsetzung der Tabelle 5

| | | | | |
|---------------------------|---|--|---------------|-----|
| EVANS und Mitarb., 1997 | PULSAR-Programm (MERRIAM und WACHTER, 1982) | frühe Lutealphase (Tag 3 oder 4 nach Östrus) | 0,65 / h | 3,9 |
| | | Tag 7 oder 8 | 0,36 / h | 2,2 |
| | | Tag 11, 12 oder 13 | 0,42 / h | 2,5 |
| CUPP und Mitarb., 1995 | PULSAR-Programm (MERRIAM und WACHTER, 1982) | Tag 4 | 4,5 / 12 h | 2,2 |
| | | Tag 5 | 4,9 / 12 h | 2,4 |
| | | Tag 6 | 4,1 / 12 h | 2,0 |
| | | Tag 7 | 2,7 / 12 h | 1,4 |
| | | Tag 8 | 4,0 / 12 h | 2,0 |
| | | Tag 9 | 2,8 / 12 h | 2,4 |
| | | Tag 10 | 3,4 / 12 h | 1,7 |
| | | Tag 11 | 3,1 / 12 h | 1,6 |
| | | Tag 12 | 2,9 / 12 h | 1,4 |
| | | Tag 13 | 2,8 / 12 h | 1,4 |
| | | Tag 14 | 3,9 / 12 h | 2,0 |
| | | Tag 15 | 4,6 / 12 h | 2,3 |
| | | Tag 16 | 6,9 / 12 h | 3,4 |
| | | Tag 17 | 4,2 / 12 h | 2,1 |
| | | Tag 18 | 4,5 / 12 h | 2,2 |
| | | Tag 19 | 7,6 / 12 h | 3,8 |
| GINTHER und Mitarb., 1998 | PULSAR-Programm (MERRIAM und WACHTER, 1982) | frühe Lutealphase (Tag 3 oder 4 nach Östrus) | ca. 18 / 24 h | 4,5 |
| INSKEEP und Mitarb., 1996 | PULSAR-Programm (MERRIAM und WACHTER, 1982) | Tag 3 nach Östrus | 5,5 / 6 h | 5,5 |

*Angaben der Autoren zur Definition des Zyklusbeginns sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Die Anzahl der in den verschiedenen Studien nachgewiesenen LH-Pulse (Tabelle 5) ist sowohl abhängig von der Pulsdefinition bzw. der Methode zur Untersuchung der pulsatischen Hormonsekretion, als auch vom Zyklusstand des Tieres. Auch durch unterschiedliche Blutentnahmeintervalle können unterschiedliche Ergebnisse bei der Bestimmung der Pulsanzahl zustande kommen (WALTERS und SCHALLENBERGER, 1984). Trotz der zwischen den einzelnen Studien variierenden Angaben zur Anzahl der LH-Pulse nach dem Tag 0 kann festgestellt werden, dass jeweils in der mittleren Lutealphase weniger LH-Pulse nachgewiesen wurden als in den übrigen untersuchten Zeiträumen (WALTERS und Mitarb., 1984; MEE und Mitarb., 1993; PETERS und Mitarb., 1994; CUPP und Mitarb., 1995; RHODES und Mitarb., 1995; EVANS und Mitarb., 1997). Ausgenommen davon ist die Zeit unmittelbar nach dem LH-Gipfel, in der durch homologe Down-Regulation der GnRH-Rezeptoren keine pulsatile LH-Ausschüttung zu beobachten ist (WEISS und Mitarb., 1995).

2.1.4.3 Nichtsteroidale Regulatoren der Gonadotropinsekretion

Die Gonadotropine liefern den primären endokrinen Stimulus für das Wachstum von Follikeln über 2 mm, aber sie sind dafür nicht allein verantwortlich. Auch andere, sowohl systemisch als auch lokal wirkende Substanzen beeinflussen die Ovarfunktion tiefgreifend (WEBB und Mitarb., 1992).

Autokrine und parakrine Prozesse, hervorgerufen durch Substanzen, die unter dem Einfluss von FSH und LH gebildet werden, bestimmen das Schicksal der an den Reifungswellen beteiligten Follikel wesentlich mit (ROCHE, 1996). Die Hypothese, dass die Modulation der Gonadotropinwirkung durch verschiedene, lokal produzierte Faktoren die Basis der Follikelselektion darstellt, konnte durch eine Vielzahl von Untersuchungen untermauert werden, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt wurden (CAMPBELL und MCNEILLY, 1996; MIHM und Mitarb., 1997).

Neben den Ovarsteroiden gibt es eine Reihe nichtsteroidaler Verbindungen, welche die Sekretion von FSH und LH beeinflussen. Dazu zählen die Glykoproteine **Inhibin** und **Aktivin** (ROCHE, 1996; ROSE und GAINES-DAS, 1996; KANEKO und Mitarb., 1997).

Inhibin ist ein Heterodimer, dessen α -Untereinheit und β -Untereinheit nichtkovalent miteinander verbunden sind. Es wird von den Granulosazellen produziert (HENDERSON und FRANCHIMONT, 1983). Die β -Untereinheit kann in zwei verschiedenen Formen, β A- und β B-Untereinheit, vorliegen. Das ermöglicht die Bildung von Inhibin A und Inhibin B. Die Inhibinsynthese wird durch Steroide und FSH stimuliert. Beim Rind ist das Inhibin ein wichtiger Faktor bei der Unterdrückung der FSH-Sekretion während der follikulären Phase. Der Einfluss des Inhibins auf die FSH-Sekretion wird in Synergie mit Estradiol ausgeübt (KANEKO und Mitarb., 1995). Die passive Immunisierung gegen Inhibin bewirkt einen signifikanten Anstieg der FSH-Basalkonzentration (KANEKO und Mitarb., 1995). Desweiteren erhöht Inhibin die LH-induzierte Androgensynthese in den Thekazellen.

Die β -Untereinheiten des Inhibins können sich zu einem Molekül verbinden (ROSE und GAINES-DAS, 1996). Dadurch entsteht das Aktivin, welches aufgrund seiner Fähigkeit der Stimulation der FSH β -Genexpression (BESECKE und Mitarb., 1996) und der FSH-Freisetzung aus der Hypophyse so benannt wurde. Aktivin nimmt daher eine Schlüsselstellung in der Regulation der FSH-Sekretion ein. Aktivin unterdrückte *in vitro* die Steroidbiosynthese von Granulosazellen, welche aus porcinen Antralfollikeln stammen. Daher spielt es eventuell bei der Follikelatresie eine Rolle (FORD und HOWARD, 1997).

Follistatin und **a₂-Makroglobulin** fungieren als Bindungsproteine für Inhibin und Aktivin. Follistatin blockiert die Aktivinwirkung durch Bindung und Neutralisation des Aktivins, und hebt dadurch die FSH-stimulierenden Effekte des Aktivins auf (BESECKE und Mitarb., 1996).

Wachstumsfaktoren sind ebenfalls an der Kontrolle von Selektion und Dominanz beteiligt. Sie haben einen lokalen Einfluss auf die gonadotropininduzierten Prozesse. Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren **IGF-I** und **IGF-II** bewirken beispielsweise die Proliferation und Differenzierung von Granulosa- und Thekazellen (MONNIAUX und Mitarb., 1997). Die Wirkungen der Gonadotropine und der IGF auf die Zellen des Ovars sind synergistisch, da die IGF die Bildung von cAMP (second messenger der Gonadotropinrezeptoren) unter dem Einfluss der Gonadotropine fördern und die Expression der steroidogenen Enzyme begünstigen (YUAN und Mitarb., 1998). Andererseits können Inhibin, Aktivin und IGF-Bindungsproteine die FSH-induzierte Estradiolproduktion hemmen (ROCHE, 1996). Der Wachstumsfaktor IGF-I fördert, im Gegensatz zu seinen Bindungsproteinen, die FSH-stimulierte Estradiolsynthese und die Ausbildung von LH-Rezeptoren auf den Granulosazellen. Dies ermöglicht dem dominanten Follikel ein Fortbestehen in einem Milieu, in dem die subordinaten Follikel derselben Reifungswelle der Regression anheimfallen (MIHM, 1996; ROCHE, 1996).

Untersuchungen auf der Transkriptionsebene lassen die Vermutung zu, dass zur Ausbildung der Dominanz die Erhöhung des mRNA-Gehaltes für IGF-I und IGF-II und eine Verringerung der mRNA des IGF-Bindungsproteins 2 (IGF-BP 2) von Bedeutung sind (YUAN und Mitarb., 1998). In ovinen und bovinen Granulosazellkulturen bewirkten IGF-I und **Insulin** die zelluläre Proliferation und die Estrogensynthese (CAMPBELL und Mitarb., 1995). Darüber hinaus sind Wachstumsfaktoren, wie der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) an parakrinen Regulationsmechanismen zwischen der reifenden Oozyte und den Granulosazellen beteiligt (DRIANCOURT und THUEL, 1998). In der Abbildung 2 sind einige endokrine und lokale Ereignisse der Regulation der Follikelreifung dargestellt.

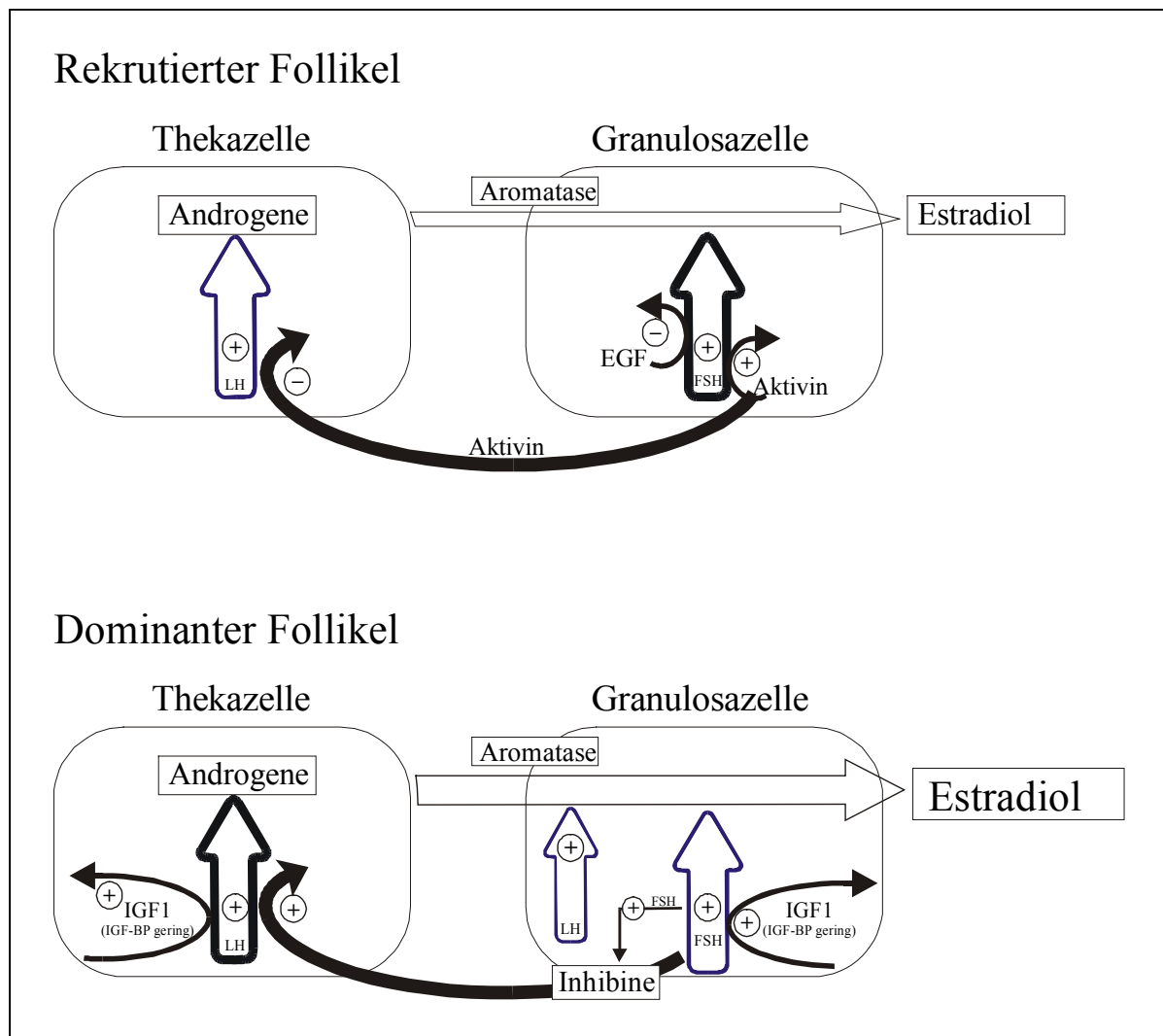


Abbildung 2. Wechselwirkungen zwischen Hormonen und Wachstumsfaktoren bei der Follikelreifung (modifiziert nach DRIANCOURT und THUEL, 1998).

2.1.4.4 Vergleich des Sekretionsverhaltens von FSH und LH

Die Bildung und Speicherung der Gonadotropine erfolgt in den Granula der gonadotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens. Die Analyse des Speicherverhaltens ergab, dass in 50 bis 100 % der gonadotropen Zellen FSH und LH gemeinsam gespeichert werden.

Diese Zellen werden als bihormonale Zellen bezeichnet. Sie kommen am häufigsten in Phasen hoher sekretorischer Aktivität vor. Es gibt jedoch auch monohormonale Zellen, die entweder FSH oder LH enthalten. Die biologische Bedeutung der Existenz bi- und monohormonaler gonadotroper Zellen ist noch nicht hinreichend geklärt (CHILDS, 1998). Nach der Bindung des GnRH an die Rezeptoren der gonadotropen Zellen wird die Synthese und Freisetzung beider Gonadotropine stimuliert. Jedoch muss auch hier darauf hingewiesen werden, dass der Grad der Einflussnahme des GnRH auf die Gonadotropine unterschiedlich sein kann (ROCHE, 1996). Während die LH-Ausschüttung bereits nach einer kurzzeitigen Stimulation mit relativ niedrigen Dosen GnRH eintritt, ist für eine vermehrte Freisetzung von FSH eine längere Einwirkung höherer Dosen erforderlich (DÖCKE, 1994). LH unterliegt offensichtlich während des Zyklus einer längeren Speicherdauer, wohingegen beim FSH nur eine kurzzeitige Zwischenlagerung vorliegt. Bekräftigt wird dies durch Untersuchungen zur Verteilung der Gonadotropine: Der Gehalt an FSH im Hypophysenvorderlappen des Schafes ist wesentlich geringer als der des LH. Er betrug etwa 2 bis 3 % des LH-Gehaltes. Während eines Zyklus werden demgegenüber pro Tag bis zu 50 % des FSH-Gehaltes freigesetzt, aber nur 1 bis 5 % des LH-Gehaltes.

Im Gegensatz zum differenzierten LH-Sekretionsverhalten in unterschiedlichen Zyklusabschnitten ist die FSH-Sekretion weniger pulsatil, komplexer reguliert und mit anderer Charakteristik als die des LH (IRELAND und ROCHE, 1983a; IGARASHI, 1988; MARTIN und Mitarb., 1988; ADAMS und Mitarb., 1992a; SUNDERLAND und Mitarb., 1994). Die FSH-Synthese wird über negative Rückkopplung durch Estradiol, Inhibin und das Aktivinbindungsprotein Follistatin auf der Ebene des Hypophysenvorderlappens reguliert (MARTIN und Mitarb., 1988). Die weitgehend unabhängig von GnRH erfolgende Freisetzung des FSH wird offenbar auch durch die selektive Stimulation des Aktivins (IGARASHI, 1988) in Kombination mit dessen Bindungsprotein Follistatin gefördert. Das bedeutet, dass parakrine Mechanismen in der Hypophyse für die selektive Sekretion des FSH verantwortlich sind. Inhibin und Estradiol beeinflussen die Hypophyse direkt und bewirken die Hemmung der Expression des Genes der FSH β -Untereinheit. Sie reduzieren Transkription und Stabilität der mRNA und mindern somit den Einfluss des GnRH auf die FSH-Freisetzung.

Die GnRH-Pulsfrequenz ist neben den gonadalen Rückkopplungsmechanismen und dem Einfluss der nichtsteroidalen Faktoren ein weiterer bedeutender Einflussfaktor auf die differenzierte FSH- und LH-Genexpression und Sekretion (WALTERS und Mitarb., 1984; REICHLIN, 1992; DÖCKE, 1994; BESECKE und Mitarb., 1996). Während eine hohe GnRH-Pulsfrequenz die LH-Synthese und Sekretion positiv beeinflusst, wird das FSH bei geringeren Frequenzen bevorzugt (JAYES und Mitarb., 1997). BESECKE und Mitarb. (1996) vermuten in diesem Zusammenhang die Existenz eines auto- oder parakrinen Aktivin/Follistatin-Rückkopplungsmechanismus, über welchen der Pool des zur Verfügung stehenden FSH beeinflusst wird und eine Änderung des FSH/LH-Verhältnisses bewirkt.

WALTERS und Mitarb. (1984) fanden, dass zusätzlich zu gemeinsam auftretenden FSH-LH-Pulsen während der mittleren Lutealphase noch separate FSH-Pulse auftraten. Die FSH-LH-Pulse waren regelmäßig mit nachfolgenden Estradiolpulsen gekoppelt, auf separate FSH-Pulse folgten jedoch keine Estradiolerhöhungen. Beim Schaf folgte auf jeden LH-Puls eine Estradiolerhöhung. Die Autoren zogen aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung, dass die Frequenz der LH-Ausschüttung zu einem größeren Teil durch die Ovarsterioide reguliert wird als die FSH-Pulsfrequenz (WALTERS und Mitarb., 1984). THOMAS und CLARKE (1997)

beschrieben, dass der positive Rückkopplungsmechanismus des Estradiols beim Schaf die Anordnung der LH enthaltenden sekretorischen Granula in der Peripherie der Hypophysenzellen bewirkt. Dahingegen kann ein solcher Einfluss auf das FSH nicht beobachtet werden.

Eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Sekretionsverhalten von FSH und LH könnte die Existenz unterschiedlicher Subpopulationen der gonadotropen Zellen sein, welche verschieden stark auf GnRH reagieren oder eine unterschiedlich lange Reaktionszeit haben (PINCUS und Mitarb., 1998). TOUGARD (1980) vermutet einen einzigen gonadotropen Zelltyp, der in einem sekretorischen Zyklus in der Lage ist, LH und FSH in Abhängigkeit der physiologischen Situation des Organismus in unterschiedlichen Proportionen zu lagern oder freizusetzen.

Tabelle 6. Literaturangaben zur Regulation der Sekretion der Gonadotropine FSH und LH

| Parameter | FSH | LH |
|---|--|--|
| Relativer Gehalt in der Hypophyse | 1 | 40 |
| Plasmakonzentrationen (ng/ml) | 0,5 bis 6,0 | 0,5 bis 100,0 |
| Halbwertszeit im Plasma (min) | 150* | 20-35 |
| GnRH-Regulation der Sekretion | teilweise | vollständig |
| Stabilität der mRNA β -Untereinheit | gering | hoch |
| Hauptregulation erfolgt durch | negatives Feedback von Estradiol und Inhibin auf der Ebene der Hypophyse, Aktivin wirkt FSH-stimulierend, sein Bindungsprotein (Follistatin) neutralisiert diese Wirkung | GnRH, <u>Lutealphase</u> : synergistischer Effekt von Estradiol und Progesteron auf der Ebene des Hypothalamus <u>Follikelphase</u> : negatives Feedback (LH-Hemmung) durch Estrogene auf der Ebene der Hypophyse, positiver Feedback-mechanismus ante ovulationem |
| Sekretionsmodus | konstitutiv, weitgehend unabhängig von GnRH, Freisetzung eng mit Syntheserate gekoppelt | GnRH-reguliert, Syntheserate und Freisetzung unabhängig voneinander, lange Zwischenlagerung |

*Die FSH-Isoformen, die innerhalb der Pulse freigesetzt werden, haben scheinbar wesentlich geringere Halbwertszeiten, als jene, die zwischen den Pulsen sezerniert werden (PADMANABHAN und Mitarb. 1997).

Die Freisetzung von FSH und LH aus denselben Zellen bedarf offenbar unterschiedlicher zellulärer Kontrollmechanismen. Die Hypothese der Existenz eines zusätzlichen, vom GnRH unabhängigen Regulationsmechanismus für die FSH-Freisetzung kann auch durch Ergebnisse aus Untersuchungen an Tieren und am Menschen bestätigt werden (MCNEILLY und Mitarb., 1988; GENAZZANI und Mitarb., 1996).

In diesem Zusammenhang wurde in den vergangenen Jahren wiederholt die Hypothese eines selektiven FSH-Releasing Faktors aufgestellt (MCCANN und Mitarb., 1993; PADMANABHAN und Mitarb., 1997; YU und Mitarb., 1997; BLAKE, 1998; CHILDS, 1998). Ein solcher Releasing-Faktor für FSH konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Eine Reihe von Ergebnissen sprechen für die komplexe Regulation der FSH-Sekretion durch bereits bekannte Faktoren. In der Tabelle 6 sind verschiedene Parameter der FSH- und LH-Sekretion und -Regulation zusammengefasst (MARTIN und Mitarb., 1988; MCNEILLY, 1988; MIHM, 1996; ROCHE, 1996).

2.1.5 Gonadale Steroidhormone

Die vom Ovar gebildeten Steroide beeinflussen neben dem Sexualverhalten der Tiere sowohl die Vorgänge an den Geschlechtsorganen (Follikelwachstum, Gelbkörperentwicklung, Auf- und Umbauprozesse der Schleimhäute), als auch die Sekretion der Gonadotropine.

Die Steroidsynthese wird durch die Gonadotropine FSH und LH stimuliert. Ausgangspunkt der Steroidbiosynthese ist Cholesterol, welches im Prozess der Endozytose über LDL und HDL in die Follikelwandzellen gelangt und in den Mitochondrien zu Pregnenolon umgewandelt wird. Pregnenolon ist die Ausgangssubstanz für die physiologisch relevanten Steroide. Die Synthese der für die Steroidbiosynthese benötigten Enzyme steht unter dem Einfluss der Gonadotropine. Die reproduktionsbiologisch bedeutsamen Steroide werden aufgrund ihrer chemischen Struktur und der biologischen Funktion in Estrogene, Gestagene und Androgene unterteilt. Im folgenden wird näher auf die Estrogene und das Progesteron eingegangen.

2.1.5.1 Estrogene

Die natürlich vorkommenden Estrogene sind C₁₈-Steroide. Sie sind durch einen aromatischen A-Ring und eine phenolische Hydroxylgruppe am C-Atom in Position 3 gekennzeichnet. Zusätzlich haben sie entweder eine weitere Hydroxylgruppe, wie das Estradiol, oder eine Ketogruppe, wie im Falle des Estrons. Estrogene bewirken unter anderem die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale bei weiblichen Organismen (CARR, 1992). Sie werden von Granulosazellen wachsendender Follikel produziert (MCNATTY und Mitarb., 1984; GINTHER und Mitarb., 1996a; EVANS und Mitarb., 1997). Das bedeutendste und potenteste vom Ovar gebildete Estrogen ist das Estradiol-17 β (E₂). Es wird durch die Cytochrom-P450-Aromatase, welche durch FSH und LH reguliert wird, aus Androstendion gebildet (IRELAND, 1987; ZELEZNIK, 1994).

Estrogene spielen eine Rolle bei der Unterdrückung der FSH-Konzentrationen im Anschluss an den FSH-Gipfel. Allerdings ist die FSH-Unterdrückung vom Gipfel bis zum Tiefstpunkt zeitlich nicht exakt einer Estrogenerhöhung zuzuordnen, was darauf schließen lässt, dass noch andere Substanzen beteiligt sind (GINTHER und Mitarb., 1996a). Die Menge des freigesetzten Estradiols könnte von der Frequenz der LH-Pulse bestimmt werden (WALTERS und Mitarb., 1984).

Der Effekt von Estradiol auf die LH-Sekretion kann, in Abhängigkeit vom endokrinen Status des Tieres, positiv oder negativ sein. Färsen, die bei einer niedrigen Progesteronkonzentration mit E₂ behandelt wurden, zeigten einen LH-Gipfel, während E₂ unter dem Einfluss einer hohen Progesteronkonzentration keinen LH-Anstieg verursachte (BO und Mitarb., 1995). Estradiol erhöht die Fähigkeit der Hypophyse, auf einen GnRH-Stimulus LH freizusetzen (KESNER und Mitarb., 1981). Das ist durch die Erhöhung der Anzahl der GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse nach Estradioleinfluss zu erklären. In Granulosazellen der Ratte scheint E₂ die FSH-stimulierte Expression der mRNA für den LH-Rezeptor zu erhöhen (RICHARDS, 1980). Beim Schaf erhöht E₂ in direkter Aktion die Anzahl der GnRH-Rezeptor-mRNA und der GnRH-Rezeptoren unabhängig von der GnRH-Sekretion (GREGG und NETT, 1989; TURZILLO und Mitarb., 1998). Desweiteren bewirkt das Estradiol die Anordnung der sekretorischen Vesikel, die LH enthalten, in der Peripherie oviner Hypophysenzellen (THOMAS und CLARKE, 1997).

2.1.5.2 Gestagene

Zu den Gestagenen zählen die C₂₁-Steroide Progesteron (P₄) und 17-Hydroxyprogesteron. Pregnenolon nimmt als Vorläufer aller Steroidhormone eine Schlüsselposition im Ovar ein. Progesteron wird vor allem von den Luteinzellen des Gelbkörpers, aber auch von Theka- und Granulosazellen des Follikels und von plazentären Zellen gebildet. Es ist verantwortlich für die sekretorische Aktivität des Uterus und spielt bei der Implantation der befruchteten Eizelle und für die Aufrechterhaltung der Gravidität eine wichtige Rolle. Es induziert die Dezidualisierung des Endometriums bei den entsprechenden Spezies, verhindert Uteruskontraktionen, erhöht die Viskosität des Zervikalschleimes und fördert die Ausbildung der Milchdrüse.

Über 80 % des vom Gelbkörper sezernierten Progesterons werden in den großen Luteinzellen gebildet, welche wahrscheinlich LH-unabhängig sind (NISWENDER und Mitarb., 1985; 1994).

17-Hydroxyprogesteron wird ebenfalls vom Gelbkörper sezerniert, es hat jedoch geringe bis keine biologische Aktivität (CARR, 1992). Da in der vorliegenden Studie von diesen Gestagenen nur das Progesteron untersucht wurde, wird in den entsprechenden Kapiteln nur auf dieses Hormon näher eingegangen.

2.2 Follikeldynamik beim Rind unter physiologischen Bedingungen

2.2.1 Numerische Aspekte

Im Ovar des Rindes gibt es einen Pool ruhender Follikel (Primordialfollikel) und einen Pool wachsender Follikel. Schon beim Kalb wurden, wie bei geschlechtsreifen Rindern, Perioden follikulärer Aktivität beobachtet, die als Follikelreifungswellen bezeichnet werden (EVANS und Mitarb., 1994). Beim Rind vollzieht sich die mitotische Phase der Oogonienentwicklung während der Tage 45 bis 150 der intrauterinen Entwicklung. In diesem Zeitraum werden etwa zwei Millionen Oogonien gebildet (BECKERS und Mitarb., 1996). Unmittelbar danach beginnt die Meiose und vollzieht sich bis zur Prophase I, die Oogonien entwickeln sich zu Oozyten I (HIRSHFIELD, 1991). Zum Zeitpunkt der Geburt liegt die Anzahl der Eizellen in der Follikelpopulation bei etwa 150 000 bis 200 000 (ERICKSON, 1966; BECKERS und Mitarb., 1996). Dieser Pool von Primordialfollikeln stellt die Basis für die Follikelentwicklung, die Formierung reifer, präovulatorischer (Graafscher) Follikel aus dem ruhenden Pool (nichtwachsender) Primordialfollikel dar (SPICER und ECHTERNKAMP, 1986). Die Primordialfollikel treten bereits in der fetalen Entwicklung in den Pool der wachsenden Follikel ein. Ovulationen erfolgen jedoch erst ab Eintritt der Geschlechtsreife. Über 99 % der rekrutierten Follikel fallen der Atresie anheim (IRELAND, 1987). Bei Rindern im Alter von 15 bis 20 Jahren ist die Anzahl der Ovarfollikel bis auf etwa 3000 gesunken (ERICKSON, 1966; WEBB und Mitarb., 1992).

Das Wachstum von Follikeln mit einer Größe von 0,1 mm bis zum ovulatorischen Follikel dauert beim Rind etwa 180 Tage (CAMPBELL und Mitarb., 1995). Die Antrumbildung setzt etwa bei einem Durchmesser ab 0,3 mm ein (pers. Mitteilung Ralf Pöhland). Von diesem Zeitpunkt an vergehen etwa noch 40 Tage, bis der Follikel mit einem Durchmesser von 14 bis 18 mm präovulatorische Größe erreicht. Bemerkenswert ist die in der Population der Antralfollikel herrschende Hierarchie mit einer recht großen Anzahl (20 bis 30) gonadotropinsensitiver Follikel, wenigen (1 bis 4) gonadotropinabhängigen Follikeln und beim Rind in der Regel einem ovulatorischen Follikel (CAMPBELL und Mitarb., 1995).

2.2.2 Prozesse des Follikelwachstums

Auf der Grundlage histologischer Untersuchungen des Ovars stellte RAJAKOSKI bereits im Jahr 1960 die Hypothese einer wellenförmigen Follikelentwicklung mit jeweils zwei Follikelreifungswellen pro Zyklus auf. MATTON und Mitarbeiter (1981) bestätigten Rajakoskis Ergebnisse ebenfalls mit Hilfe histologischer Untersuchungen. IRELAND und ROCHE (1983a) fanden durch die Untersuchung von Follikelgrößen und auf der Grundlage von Steroidhormonbestimmungen im Blut sowie in der Follikelflüssigkeit Hinweise für einen dreiwelligen Follikelwachstumsverlauf. Im Gegensatz dazu unterstützen andere Autoren die Hypothese eines kontinuierlichen Follikelwachstums mit schnell einsetzender Atresie, infolgedessen im Verlauf des Zyklus zunehmend große Follikel erscheinen, und ein Follikel zum ovulatorischen Follikel selektiert wird (SPICER und ECHTERNKAMP, 1986).

Die Technik der transrektalen Ultrasonographie (PIERSON und GINTHER, 1984) eröffnete neue Möglichkeiten zur Aufklärung ovarphysiologischer Prozesse. Diese nichtinvasive Methode ermöglicht die wiederholte und direkte Erhebung von Daten über ovarielle Prozesse am lebenden Tier und erbrachte die Bestätigung der wellenförmigen Follikelentwicklung beim Rind. Follikelreifungswellen sind gekennzeichnet durch das gleichzeitige Auftreten einer Gruppe (zwei bis fünf) wachsender Follikel mit einem Durchmesser von 4 bis 5 mm. Aus dieser Gruppe erlangt ein Follikel Dominanz, die anderen sind subordinate Follikel (SAVIO und Mitarb., 1988; SIROIS und FORTUNE, 1988; GINTHER und Mitarb., 1989b). Die Anzahl der Follikelreifungswellen pro Zyklus variiert zwischen den einzelnen Studien. Einige Autoren fanden **zwei Follikelreifungswellen** in der Mehrzahl der beobachteten Zyklen (PIERSON und GINTHER, 1987a; PIERSON und GINTHER 1988a; GINTHER und Mitarb., 1989a,b; KNOFF und Mitarb., 1989; AHMAD und Mitarb., 1997). In anderen Studien überwiegt die Zahl der Zyklen mit einem **dreiwelligen Follikelwachstumsverlauf** (SIROIS und FORTUNE, 1988; GONG und Mitarb., 1993) bzw. mit drei nacheinander auftretenden dominanten Follikeln (SAVIO und Mitarb., 1988), während in seltenen Fällen auch vier Follikelreifungswellen beobachtet wurden (SIROIS und FORTUNE, 1988). Weshalb und unter welchen Bedingungen zwei, drei oder vier Follikelreifungswellen pro Zyklus auftreten, ist noch nicht hinreichend aufgeklärt (DE RENSIS und PETERS, 1999). Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die Ausprägung der Anzahl von Follikelreifungswellen populationsbezogen ist. Eventuell gibt es Tiere, die bevorzugt entweder zwei oder drei Follikelreifungswellen ausbilden (KNOFF und Mitarb., 1989). Zur Ausprägung eines zweiwelligen Wachstumsverlaufes kommt es offenbar dann, wenn der Gelbkörper zeitig zurückgebildet wird und der dominante Follikel der zweiten Reifungswelle zu diesem Zeitpunkt noch intakt ist (SIROIS und FORTUNE, 1988, GINTHER und Mitarb., 1989b). Höhere Progesteronkonzentrationen während der Lutealphase erhöhen möglicherweise die Rate des Follikelturnover (Ablösung des dominanten Follikels) bzw. den Anteil von Zyklen mit drei Follikelreifungswellen. Niedrigere Progesteronkonzentrationen hingegen sind mit zweiwelligen Follikelwachstumsverläufen verbunden (DIAZ und Mitarb., 1998). Die Anzahl der Follikelreifungswellen kann jedoch auch durch die Futteraufnahme beeinflusst werden. Eine geringe Futteraufnahme geht mit verringerten Durchmessern und verkürzter Persistenz der dominanten Follikel einher und erhöht somit tendenziell den Anteil von Zyklen mit drei Follikelreifungswellen (MURPHY und Mitarb., 1991). Durch die Laktation wird die Follikeldynamik ebenfalls beeinflusst. Die Anzahl mittelgroßer Follikel in der ersten Follikelreifungswelle ist bei laktierenden Tieren geringer als bei nichtlaktierenden. Es gibt in der mittleren bis späten Lutealphase bei laktierenden Rindern mehr Follikel mit einem Durchmesser > 15 mm. Während der Entwicklung des präovulatorischen Follikels ist die Estradiolkonzentration im Blut laktierender Rinder geringer als bei nichtlaktierenden (LUCY und Mitarb., 1992).

Jede Follikelreifungswelle ist gekennzeichnet durch das Auftreten der **Prozesse Rekrutierung, Selektion und Dominanz** (HODGEN, 1982; DRIANCOURT, 1991, Abbildung 3). Der Begriff Rekrutierung beschreibt hierbei die Aufnahme von Follikeln in eine Follikelreifungswelle. Die Follikel einer Reifungswelle erreichen mit Eintritt in die Rekrutierung die Phase der obligaten Gonadotropinabhängigkeit und erlangen somit die

Möglichkeit der Weiterentwicklung (eventuell bis zum dominanten Follikel; HODGEN, 1982; HIRSHFIELD, 1991; FORTUNE, 1994).

Beim Rind werden in der Regel zwei bis fünf Follikel als Gruppe rekrutiert. Das Schlüsselhormon für die Rekrutierung ist das FSH. Etwa zwei bis drei Tage vor dem Auftreten einer Follikelreifungswelle kommt es zu einem Anstieg des FSH. Der sich anschließende Abfall der FSH-Konzentrationen fällt zeitlich mit dem Auftreten der Follikelkohorte zusammen (ADAMS und Mitarb., 1992a; SUNDERLAND und Mitarb., 1994; RHODES und Mitarb., 1995). Die geringsten FSH-Konzentrationen werden zum Zeitpunkt der Wachstumsdifferenzierung beobachtet (ADAMS und Mitarb., 1992a; GINTHER und Mitarb., 1997). Der künftige dominante Follikel und die subordinaten Follikel haben anfangs gleiche Wachstumsraten. Etwa zwei bis drei Tage nach dem Auftreten der Follikelreifungswelle, bei Follikeldurchmessern von etwa 6 bis 8 mm, erfolgt die Differenzierung. Ab diesem Zeitpunkt weichen die Wachstumsraten der Follikel voneinander ab (ADAMS und Mitarb., 1992a; GINTHER und Mitarb., 1996a; GINTHER und Mitarb., 1997; GINTHER und Mitarb., 1998). Es kommt zum Selektionsprozess, wobei beim Rind in der Regel ein Follikel der Atresie entgeht und eine weitere Entwicklung zum ovulationskompetenten Follikel erfährt (HODGEN, 1982). Selektion ist demnach die Angleichung der Anzahl rekrutierter Follikel an die tierartsspezifische Anzahl der Ovulationen pro Zyklus. Sie wird maßgeblich durch FSH, Estradiol und Inhibin beeinflusst.

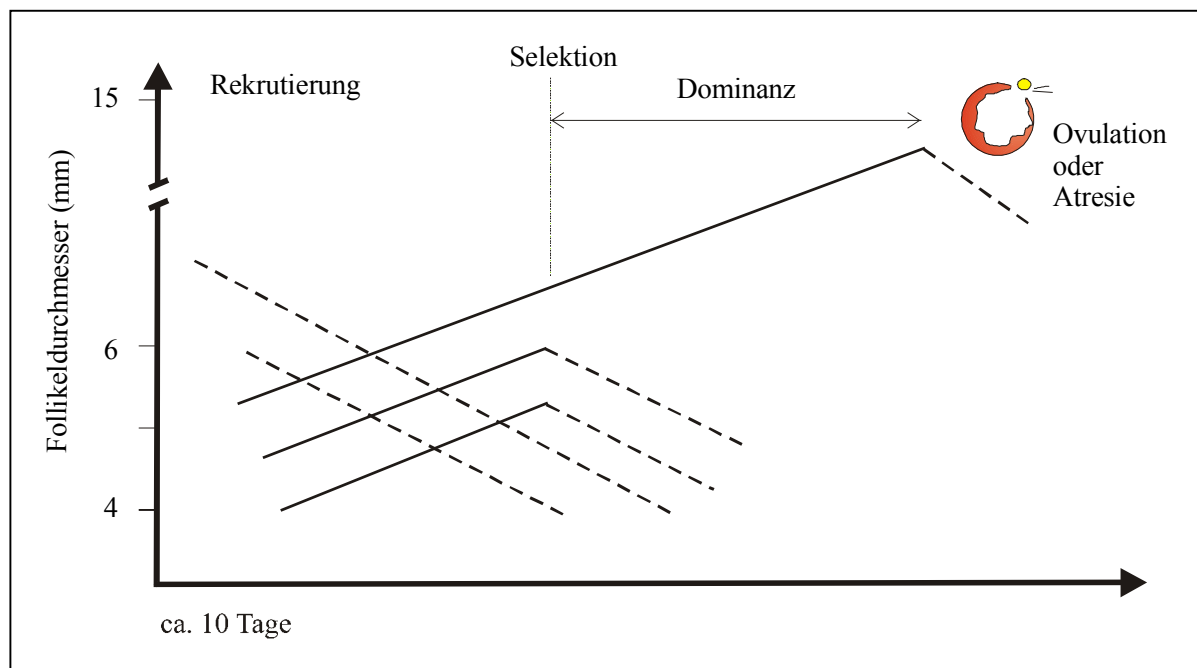


Abbildung 3. Schematische Darstellung von Rekrutierung, Selektion und Dominanz während einer Follikelreifungswelle, die bei einem zweiwelligen Follikelwachstumsverlauf etwa 10 Tage dauert (modifiziert nach DRIANCOURT, 1991).

Der aus dem Selektionsprozess hervorgehende Follikel ist der dominante, die übrigen Follikel fallen der Regression (Atresie) anheim (ADAMS und Mitarb., 1992a). Dominanz ist demzufolge die Phase der Wachstums- und Entwicklungsüberlegenheit eines Follikels nach dessen Hervorgehen aus dem Selektionsprozess (HODGEN, 1982). Beim Rind hat der dominante Follikel einen wesentlich größeren Inhibingehalt und einen höheren

Estradiolgehalt als die subordinaten Follikel. Während der Entwicklung eines präovulatorischen Follikels steigen die Inhibin- und Estradiolkonzentrationen im Blut an (PADMANABHAN und Mitarb., 1984; MIHM und Mitarb., 1997).

Es existiert ein negativer Feedback-Mechanismus zwischen Estradiol und Inhibin aus dem dominanten Follikel und der FSH-Sekretion der Hypophyse (IRELAND, 1987; FORTUNE und Mitarb., 1988; MARTIN und Mitarb., 1988). Jüngere Studien lassen auch auf eine Bedeutung des Follistatins in der Kontrolle der finalen Stadien der Follikelentwicklung schließen (SINGH und ADAMS, 1998). Die Fähigkeit des dominanten Follikels IGF-I zu bilden, ist offenbar entscheidend für die kontinuierliche Estrogenproduktion des dominanten Follikels. IGF-I hat einen stimulierenden Effekt auf die Ovarfunktion. Er fördert die FSH-stimulierte Estradiolsynthese sowie die Proliferation und die Entwicklung von LH-Rezeptoren auf den Granulosazellen (CAMPBELL und Mitarb., 1995; MIHM und Mitarb., 1996; ROCHE, 1996; MIHM und Mitarb., 1997). Der estrogenaktive dominante Follikel bildet ab einem Durchmesser von 8 bis 9 mm neben den FSH-Rezeptoren auch LH-Rezeptoren aus (IRELAND und ROCHE 1983a,b; XU und Mitarb., 1995). BAO und Mitarb. (1997) wiesen in den Granulosazellen boviner Follikel dieser Größe die Expression von mRNA für den LH-Rezeptor nach.

Das LH gewinnt in dieser Phase an Bedeutung für das finale Follikelwachstum. Die Fähigkeit der Granulosazellen zur Bindung von Gonadotropinen verändert sich in Abhängigkeit vom physiologischen Stadium des Follikels. Die Anzahl der LH-Rezeptoren steigt, die der FSH-Rezeptoren sinkt während des Wachstums eines estrogenaktiven Follikels in der Phase des Östrus und des zeitigen Diöstrus. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der dominante Follikel bei sinkenden FSH-Konzentrationen seine weitere Entwicklung durch Ausbildung von LH-Rezeptoren auf den Granulosazellen sichert, während subordinate Follikel dazu nicht in der Lage sind (IRELAND und ROCHE, 1982b,1983a,b). Insbesondere die LH-Pulsfrequenz ist ausschlaggebend für das Schicksal des dominanten Follikels (ROCHE, 1996). Nur wenn in der Wachstumsphase oder im frühen Stadium der Dominanz der Gelbkörper zurückgebildet wird, kann ein vorhandener dominanter Follikel (in Einzelfällen sind es zwei dominante Follikel) zur Ovulation gelangen. Während der Lutealphase hemmt die hohe Progesteronkonzentration einerseits die Estradiolsynthese und realisiert andererseits über den negativen Rückkopplungsmechanismus die Hemmung der pulsatilen LH-Sekretion. Dies bewirkt den Turnover der anovulatorischen Follikelreifungswellen, die "Ablösung" des anovulatorischen Follikels (SAVIO und Mitarb., 1993).

Die Frage nach dem Schlüsselereignis für die Abfolge der Prozesse der Follikeldynamik ist noch immer ungeklärt (IRELAND, 1987; BAO und GARVERICK, 1998). IRELAND (1987) postulierte, dass der Turnover der dominanten Follikel während der Reifungswellen durch die unterschiedliche Reaktivität selektierter und unselektierter Follikel der Kohorte auf Änderungen in der Gonadotropinsekretion zurückzuführen ist. Ergebnis dieser differenzierten Reaktion ist die Produktion intrafollikulärer stimulierender oder hemmender Substanzen, welche die Prozesse Selektion, Dominanz und Atresie steuern. Es wird angenommen, dass der dominante Follikel hormonelle und nichthormonelle Faktoren sezerniert, welche die gonadotropin-induzierten Wachstums- und Differenzierungsprozesse der übrigen Follikel beeinflussen (IRELAND, 1987). Die differenzierte Expression von Faktoren, welche die Wirkung der Gonadotropine auf die Zellen des Follikels an wichtigen Punkten seiner Entwicklung modulieren, wird als physiologische Basis der Selektion angesehen (CAMPBELL

und Mitarb., 1995; MIHM und Mitarb., 1997). Das fortgesetzte Wachstum und die gesteigerte Estradiolproduktion des selektierten Follikels während des Abfallens der FSH-Konzentration kann zumindest teilweise auf eine erhöhte intrafollikuläre Konzentration und Bioverfügbarkeit von IGF-I, gekoppelt mit einer gleichzeitigen Reduktion des Gehaltes an IGF-BP, zurückgeführt werden (MIHM und Mitarb., 1997). In Beziehung zur gesteigerten Estradiolproduktion des selektierten Follikels konnte eine Verringerung des intrafollikulären Gehaltes an Inhibinen (34- und 49-kDa-Inhibin) festgestellt werden, die eventuell zu einer erhöhten FSH-Bioaktivität führt (MIHM und Mitarb., 1997).

Im folgenden Abschnitt soll ein Einblick in den zeitlichen Verlauf von Follikelreifungswellen gegeben werden. In der Literatur wird der Beginn des Zyklus (Tag 0) von einigen Autoren als Tag der Brunst (SAVIO und Mitarb., 1988; SIROIS und FORTUNE, 1988; BADINGA und Mitarb., 1992; GONG und Mitarb., 1993; PETERS und Mitarb., 1994; CUPP und Mitarb., 1995; AHMAD und Mitarb., 1997; EVANS und Mitarb., 1997) festgelegt, von anderen Autoren wird er als Tag der Ovulation bezeichnet (GINTHER und Mitarb., 1989a,b; KNOPF und Mitarb., 1989; RHODES und Mitarb., 1995; WALTERS und Mitarb., 1984). Da die Ovulation später eintritt als die Brunst, ist es notwendig, zeitbezogene Angaben zu transformieren, wenn diese aus verschiedenen Studien miteinander verglichen werden sollen (BODENSTEINER und Mitarb., 1996). Wird der Tag der Brunst als Bezugspunkt gewählt, so müssen zu den zeitbezogenen Angaben aus den Studien, die den Zyklusbeginn mit dem Zeitpunkt der Ovulation definieren, 24 Stunden addiert werden (Variante 1). Wird der Zeitpunkt der Ovulation als Bezugspunkt für den Zyklusbeginn gewählt, so müssen von den zeitbezogenen Angaben aus den Studien, in denen der Tag der Brunst als Tag 0 bezeichnet wird, 24 Stunden subtrahiert werden (Variante 2). Da in der eigenen Arbeit der Tag 0 mit dem Tag der Brunst übereinstimmt, wurde für die Auswertung der Literaturangaben die Variante 1 gewählt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Tabelle 7 die verschiedenen Studien mit ihrer jeweiligen Festlegung für den Beginn des Zyklus nochmals aufgeführt.

Tabelle 7. Definition der verschiedenen Autoren zum Tag des Zyklusbeginns

| Autoren | Tag | Definition |
|--|------------|-------------------|
| SAVIO und Mitarb., 1988; SIROIS und FORTUNE, 1988; BADINGA und Mitarb., 1992; GONG und Mitarb., 1993; PETERS und Mitarb., 1994; SUNDERLAND und Mitarb., 1994; CUPP und Mitarb., 1995; AHMAD und Mitarb., 1997; EVANS und Mitarb., 1997 | Tag 0 | Tag der Brunst |
| PIERSON und GINTHER, 1987a; GINTHER und Mitarb., 1989a; GINTHER und Mitarb., 1989b; KÄHN, 1989; ADAMS und Mitarb., 1992a; KNOPF und Mitarb., 1989; RHODES und Mitarb., 1995 | Tag 0 | Tag der Ovulation |
| WALTERS und Mitarb., 1984 | Tag 1 | Tag der Ovulation |

Im Falle eines zweiwelligen Follikelwachstumsverlaufes beginnt die erste anovulatorische Follikelreifungswelle am Zyklustag 1 und die zweite, ovulatorische Follikelreifungswelle erscheint am Tag 11 des Zyklus (GINTHER und Mitarb., 1989b; KNOPF und Mitarb., 1989). Bei einem dreiwelligen Wachstumsverlauf werden von denselben Autoren die Tage 1, 10 bzw. 11 und 17 als Beginn der Follikelreifungswellen angegeben (GINTHER und Mitarb.,

1989b; KNOFF und Mitarb., 1989), während andere Autoren die Tage 2, 9 und 16 ermittelten (SIROIS und FORTUNE, 1988; GONG und Mitarb., 1993).

Der erste dominante Follikel kann etwa am Zyklustag 4 identifiziert werden (SAVIO und Mitarb., 1988). Er wächst bis zu einem maximalen Durchmesser von 15 bis 16 mm, der am Tag 6 bis 8 erreicht ist (GINTHER und Mitarb., 1989b; KNOFF und Mitarb., 1989; SAVIO und Mitarb., 1988; BADINGA und Mitarb., 1992). Nach einer Phase der Stagnation bildet sich dieser Follikel etwa ab Tag 11 zurück (SAVIO und Mitarb., 1988; GINTHER und Mitarb., 1989a; KNOFF und Mitarb., 1989; BADINGA und Mitarb., 1992). Das Wachstumsprofil des dominanten Follikels der ersten Follikelreifungswelle unterscheidet sich zwischen zwei- bzw. dreiwelligem Follikelwachstumsverlauf nicht (GINTHER und Mitarb., 1989b).

Der nächste dominante Follikel wird während der zweiten Follikelreifungswelle etwa am Tag 10 hervorgebracht. Seine Dominanz ist am Tag 12 erkennbar. Bei einem dreiwelligen Follikelwachstumsverlauf erreicht er am Tag 16 sein Größenmaximum, bildet sich dann zurück und ist am Tag 19 bereits nicht mehr individuell zu identifizieren. Der dritte dominante Follikel kann am Tag 16 identifiziert werden und erreicht am Tag 21 sein Maximum (SAVIO und Mitarb., 1988).

Die Wachstumsrate des ersten dominanten Follikels ist größer als die des zweiten (GINTHER und Mitarb., 1989a; KNOFF und Mitarb., 1989). Dies wird auch durch die Feststellung belegt, dass das Follikelwachstum in der Phase des Mittzyklus am langsamsten vonstatten geht (SAVIO und Mitarb., 1988). Die Zykluslänge beträgt bei einem zweiwelligen Follikelwachstumsverlauf 20 Tage und ist damit deutlich kürzer als bei einem dreiwelligen Follikelwachstum mit 23 Tagen (GINTHER und Mitarb., 1989b; KNOFF und Mitarb., 1989; AHMAD und Mitarb., 1997). Bei zweiwelligem bzw. dreiwelligem Follikelwachstumsverlauf unterscheiden sich die ovulatorischen Follikel durch in Tabelle 8 dargestellte Merkmale (GINTHER und Mitarb., 1989b; AHMAD und Mitarb., 1997).

Tabelle 8. Unterschiede der ovulatorischen Follikel bei zwei- bzw. dreiwelligem Follikelwachstumsverlauf

| Merkmal | Zweiwelliger Follikelwachstumsverlauf | Dreiwelliger Follikelwachstumsverlauf |
|---|--|--|
| Tag des Auftretens | Tag 10 | Tag 16 |
| Intervall vom Erscheinen des ovulatorischen Follikels bis zur Ovulation | 11 Tage | 7 Tage |
| Durchmesser vor der Ovulation | 16 mm | 14 mm |

Am ersten Tag der Follikelreifungswelle ist noch kein Unterschied zwischen den beteiligten Follikeln erkennbar. Signifikante Differenzen zwischen dem späteren dominanten Follikel und den subordinaten Follikeln sind erst am folgenden Tag nachweisbar. Durchschnittlich vier bis fünf Tage nach Auftreten der Follikelreifungswelle stellen die subordinaten Follikel ihr Wachstum ein (GINTHER und Mitarb., 1989a). MIHM und Mitarb. (1997) gaben für den Zeitraum der Selektion die Zyklustage 3 bis 5 an. Andere Autoren vermuteten anhand von Untersuchungen der mRNA für Gonadotropinrezeptoren und steroidogene Enzyme, dass die

Selektion des dominanten Follikels bereits etwa 36 bis 48 Stunden nach dem Auftreten einer Follikelreifungswelle erfolgt (BAO und Mitarb., 1997).

Um die Entwicklung der Follikel innerhalb des dynamischen Prozesses genauer beschreiben zu können, erfolgt in der Literatur die Einteilung der auf den Ovarien befindlichen Follikel in zumeist drei Größenklassen (BADINGA und Mitarb., 1992; GONG und Mitarb., 1993; AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Sie umfassen kleine, mittelgroße und große Follikel. Andere Autoren nehmen eine Unterteilung in vier bzw. fünf Größenklassen vor (PIERSON und GINTHER, 1987a; KÄHN, 1989; LUCY und Mitarb., 1992). Die Tabelle 9 gibt einen Überblick über die von verschiedenen Autoren verwendeten Größenklassen.

Tabelle 9. Übersicht über die von verschiedenen Autoren verwendeten Follikelgrößenklassen

| Anzahl der Größenklassen | Autoren | Follikelgrößenklassen (in mm) |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| 3 | BADINGA und Mitarb., 1992 | 3-4; 5-9; ≥ 10 |
| | GONG und Mitarb., 1993 | < 5 ; 5-10; > 10 |
| | AMBROSE und Mitarb., 1998 | 2-5; 6-9; > 9 |
| | RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998 | ≤ 5 ; 6-9; ≥ 10 |
| 4 | KÄHN, 1989 | 5-7; 8-10; 11-13; ≥ 14 |
| | LUCY und Mitarb., 1992 | 3-5; 6-9; 10-15; > 15 |
| 5 | PIERSON und GINTHER, 1987a | 2-3; 4-6; 7-10; 10-13; > 13 |

Darüber hinaus wurde das Wachstum individueller Follikel (FORTUNE und Mitarb., 1988; SAVIO und Mitarb., 1988; SIROIS und FORTUNE, 1988; PIERSON und GINTHER, 1988a; GINTHER und Mitarb., 1997) ausgewertet, um Rückschlüsse auf die Gesetzmäßigkeiten der ovariellen Aktivitäten ziehen zu können.

GINTHER und Mitarb. (1996a) bezifferten die Anzahl der an einer Follikelreifungswelle teilnehmenden Follikel ab einem Durchmesser von 3 mm auf durchschnittlich 24 (8 bis 41). Von diesen erreichen jedoch durchschnittlich nur sieben Follikel einen Durchmesser über 6 mm. FORTUNE und Mitarb. (1988) fanden bei einem dreiwelligen Wachstumsverlauf vier bis fünf Follikel ab einer Größe von 5 mm pro Follikelreifungswelle. Im Verlauf des Zyklus ist die Follikelanzahl in den Größenklassen nicht konstant, sondern weist (außer in den Kategorien 4 bis 6 mm und Gesamtanzahl) ein bimodales Verhalten auf (PIERSON und GINTHER, 1987a). Auch die Anzahl aller sichtbaren Follikel > 2 mm ist während des Zyklus nicht konstant. Sie rangiert zwischen 29 und 36 Follikeln, steigt etwa ab Tag 9, erreicht zur Ovulation ihr Maximum und fällt dann wieder ab (PIERSON und GINTHER, 1987a). Die Tabelle 10 verdeutlicht die Perioden des bimodalen Verhaltens der Follikel in den von PIERSON und GINTHER (1987a) gewählten Größenklassen.

Tabelle 10. Follikelgrößenklassen, Anzahl der beteiligten Follikel und die Perioden zur Kennzeichnung des bimodalen Follikelwachstumsverhaltens (PIERSON und GINTHER, 1987a).

| Follikelgrößenklasse | Follikelanzahl Angaben näherungsweise, da aus Abbildung entnommen | Perioden, welche das bimodale Verhalten kennzeichnen |
|-----------------------------|---|---|
| 2 - 3 mm | 20 - 26 | Tage 2 - 12 und 13 - 21 |
| 4 - 6 mm | 4 - 11 | Kein bimodales Verhalten |
| 7 - 10 mm | 0,5 - 3,1 | Tage 1 - 7 und 8 - 19 |
| 10 - 13 mm | 0 - 1 | Tage 1 - 9 und 10 - 21 |
| > 13 mm | 0 - 0,7 | Tage 3 - 15 und 17 - 22 |
| Gesamt, ab 2 mm | 29 - 36 | Kein bimodales Verhalten |

Die höchste Anzahl an Follikeln der Größe 1 bis 3 mm wiesen MATTON und MITARB. (1981) am Tag 3 nach. An den Tagen 1 bis 5 sinkt die Anzahl der kleinen Follikel mit einem Durchmesser von 3 bis 5 mm (BADINGA und Mitarb., 1992; LUCY und Mitarb., 1992), während es zu einem Anstieg in der Klasse der mittelgroßen Follikel (6 bis 9 mm) kommt (KÄHN, 1989; LUCY und Mitarb., 1992). Der Anstieg der Follikel mittlerer Größe verdeutlicht das Wachstum der kleinen Follikel und ihr anschließendes Auftreten in der folgenden Größenklasse. Etwa am Tag 5 tritt ein großer Follikel (>10 mm) auf. Zur selben Zeit sinkt die Zahl der mittelgroßen Follikel wieder, welche nicht dominant wurden und der Atresie anheimfallen. Die Anzahl der mittelgroßen Follikel bleibt durch den hemmenden Einfluss des dominanten Follikels auf die Rekrutierung einer neuen Follikelkohorte bis zum Tag 10 bis 12 niedrig (DRIANCOURT, 1991; LUCY und Mitarb., 1992).

Die Ausbildung der Dominanz des (meist) größten Follikels der ersten Reifungswelle erfolgt um den Zyklustag 5 (BADINGA und Mitarb., 1992). Er bleibt etwa bis zur Zyklusmitte aktiv und die funktionelle Atresie setzt an den Tagen 8 bis 12 ein (BADINGA und Mitarb., 1992). Die Größe der subordinaten Follikel der ersten Reifungswelle nahm an den Tagen 1 bis 3 zu und an den Tagen 6 bis 11 (5 bis 9; KÄHN, 1989) verringerten sich die Durchmesser dieser Follikel wieder. Dieser Größenabfall war mit einer Verringerung der Anzahl mittelgroßer und kleiner Follikel verbunden, was erneut bestätigt, dass der dominante Follikel im Anschluss an die Selektionsphase tatsächlich einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum der subordinaten Follikel ausübt (KÄHN, 1989; DRIANCOURT, 1991; FORTUNE und Mitarb., 1991; GONG und Mitarb., 1991; BADINGA und Mitarb., 1992; WEBB und Mitarb., 1992).

Etwa am Tag 11 steigt die Anzahl der kleinen Follikel, vermutlich bedingt durch den mittzyklischen FSH-Anstieg, wieder an (KÄHN, 1989; BADINGA und Mitarb., 1992). MATTON und Mitarb. (1981) fanden am Tag 13 die größte Anzahl der Follikel der Größe 3 bis 6 mm. KÄHN (1989) beobachtete ein Wachstum der subordinaten Follikel bis zur Mitte der zweiten Diöstrushälfte (Tag 15 bis 17), danach verringerten sie bis zur Ovulation ihre Durchmesser wieder.

PIERSON und GINTHER (1988b) ermittelten bei zweiwelligem Follikelwachstum, dass die Selektion des dominanten Follikels der zweiten Reifungswelle an den Tagen 17 und 18, also etwa drei bis vier Tage vor der Ovulation, erfolgt. Der Durchmesser des ovulatorischen Follikels betrug $16,6 \pm 1,4$ mm. KÄHN (1989) beobachtete durchschnittliche Durchmesser der ovulatorischen Follikel von 15 mm mit einer Schwankungsbreite zwischen 10 und 20 mm.

Zwei Tage vor der Ovulation war der dominante Follikel bei 35 % der Tiere der größte feststellbare Follikel. Einen Tag vor der Ovulation lag der Wert bei 74 % und am Tag der Ovulation bei 100 % (SIROIS und FORTUNE, 1988). Die Verringerung der Gelbkörpergröße begann bei zweiwelligem Follikelwachstum am Tag 17. Bei einem dreiwelligen Follikelwachstumsverlauf war die Rückdung des Gelbkörpers etwa ab dem Tag 20 ultrasonographisch feststellbar (GINTHER und Mitarb., 1989b).

2.2.3 Follikeldynamik und Gonadotropine

Die Gonadotropine FSH und LH sind die wichtigsten Proteohormone, die an der Follikelentwicklung beteiligt sind. Infolge der Bindung an ihre Rezeptoren und der Aktivierung von cAMP-abhängigen Prozessen erhöhen sie die Steroidbiosynthese in Granulosa- und Thekazellen. Durch die Steigerung der Synthese von Steroiden -insbesondere von Estrogenen- kommt es zur Konzentrationserhöhung dieses Steroids in der Follikelflüssigkeit und im Blutkreislauf (IRELAND, 1987).

Die Follikelentwicklung kann beim Rind in Abhängigkeit von den follikulären Ansprüchen an das Gonadotropinmilieu in zwei Abschnitte gegliedert werden. Der erste Abschnitt ist die basale Follikelentwicklung, die, zumindest teilweise, in Abwesenheit der Gonadotropine ablaufen kann. Der zweite Abschnitt ist die tonische Follikelentwicklung, welche die Anwesenheit der Gonadotropine erfordert (DRIANCOURT und FRY, 1988; GONG und Mitarb., 1996). Die tonische Follikelentwicklung beginnt, wenn die Follikel beim Rind einen Durchmesser von etwa 4 mm haben (MOSER und Mitarb., 1989). Die frühen Stadien der Follikelentwicklung erfordern nach den vorliegenden Erkenntnissen keine oder lediglich basale Gonadotropinkonzentrationen, ab einem Follikeldurchmesser von 4 bis 9 mm ist FSH nötig, das Follikelwachstum über 9 mm erfordert LH (GONG und Mitarb., 1996). In den folgenden Abschnitten wird genauer auf den Einfluss von FSH bzw. LH auf die Follikelentwicklung eingegangen.

2.2.3.1 Follikeldynamik und FSH

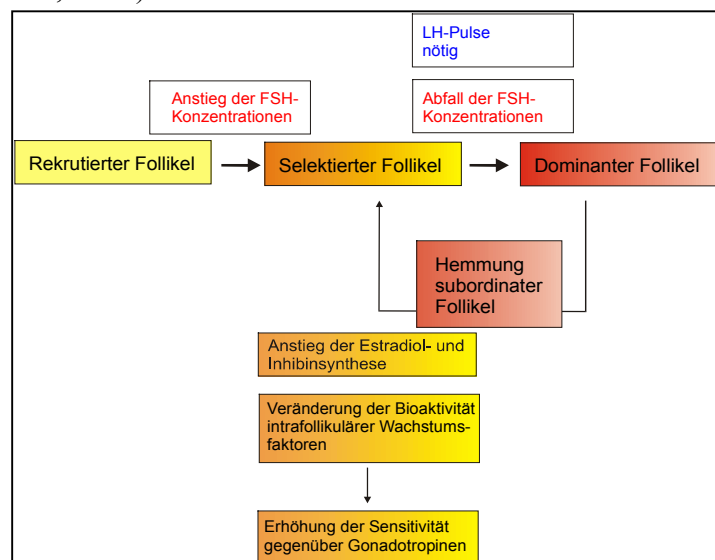
Die Beziehungen zwischen der zirkulierenden FSH-Konzentration und dem Follikelwachstum sind beim Rind unter Beachtung der Zeit des Auftretens einer neuen Follikelreifungswelle und der Zeit der Wachstumsdifferenzierung oder Selektion zwischen dominantem und subordinaten Follikeln beschrieben worden (ADAMS und Mitarb., 1992a; GINTHER und Mitarb., 1996a,b; BERGFELT und Mitarb., 1997; GINTHER und Mitarb., 1997; GINTHER und Mitarb., 1998). FSH ist das Schlüsselhormon für den Beginn einer neuen Follikelreifungswelle. Die FSH-Konzentration steigt etwa zwei Tage vor dem Auftreten einer Follikelreifungswelle an und erreicht zum Zeitpunkt des Auftretens dieser ihre maximale Konzentration. Innerhalb der folgenden Tage fällt sie wieder. (ADAMS und Mitarb., 1992a; SUNDERLAND und Mitarb., 1994; EVANS und Mitarb., 1997). Die geringste FSH-Konzentration wurde am Tag 4 des Zyklus (EVANS und Mitarb., 1997) beziehungsweise zum Zeitpunkt der Wachstumsdifferenzierung beobachtet (ADAMS und Mitarb., 1992a; GINTHER und Mitarb., 1996a; 1997).

Der Rückgang der FSH-Konzentration nach dem Auftreten der Follikelreifungswelle ist auf die Sekretion wachsender Follikel ab einem Durchmesser von 5 mm zurückzuführen (GIBBONS und Mitarb., 1997, Abbildung 4). Follikel, die von 3 bis 5 mm wachsen, erlangen die Fähigkeit, die systemische FSH-Konzentration zu senken (GIBBONS und Mitarb., 1999). Es wird vermutet, dass die FSH-Sekretion von Androgenen und Estrogenen sich entwickelnder Follikel gehemmt wird (EVANS und Mitarb., 1997). Auch das Inhibin spielt bei diesen Vorgängen eine wichtige Rolle (KANEKO und Mitarb., 1997; MIHM und Mitarb., 1997). Die FSH-Konzentration bleibt für die folgenden drei bis vier Tage auf niedrigem Niveau (GINTHER und Mitarb., 1996a).

In zeitlichem Zusammenhang zur Wachstumsdifferenzierung konnte jedoch keine deutliche Veränderung der Gonadotropinsekretion festgestellt werden, welche für die Divergenz verantwortlich gemacht werden könnte (GINTHER und Mitarb., 1998). Während ansteigende FSH-Konzentrationen für die Initiierung des Follikelwachstums notwendig sind (ADAMS und Mitarb., 1992a; BERGFELT und Mitarb., 1997), haben verringerte FSH-Konzentrationen zur Erhaltung des dominanten Follikels vor und nach der Selektion Bedeutung (KASTELLIC und Mitarb., 1990; TURZILLO und FORTUNE 1990, TURZILLO und FORTUNE 1993; BERGFELT und Mitarb., 1997). Nach Ergebnissen von MIHM und Mitarb. (1997) scheint der Abfall der FSH-Konzentration sogar die Veränderungen der Verfügbarkeit und/oder Synthese der intrafollikulären Inhibine, des IGF-I und der IGF-BP in Gang zu setzen. Diese Veränderungen kennzeichnen das Ende des Selektionsprozesses und den Beginn der Dominanzphase des selektierten Follikels (MIHM und Mitarb., 1997).

Abbildung 4.

Beziehungen zwischen der Gonadotropinsekretion und der Estradiol- und Inhibinsekretion wachsender Follikel während der Entwicklung der follikulären Dominanz beim Rind (modifiziert nach ARMSTRONG und WEBB, 1997).



Es besteht eine enge Korrelation zwischen den Tagen des Auftretens dominanter Follikel und den Zeitpunkten maximaler FSH-Konzentrationen. Bei zweiwelligem Follikelwachstum treten zwei FSH-Erhöhungen im Zyklus auf, während es bei einem dreiwelligem Follikelwachstumsverlauf zu drei FSH-Gipfeln innerhalb des Zyklus kommt (ADAMS und Mitarb., 1992a; SUNDERLAND und Mitarb., 1994). Die mittzyklischen FSH-Konzentrationserhöhungen (am Tag 10 bei zweiwelligem Follikelwachstum und an den Tagen 9 und 15 bei dreiwelligem Follikelwachstum) traten immer in der statischen Phase des dominanten, anovulatorischen Follikels auf, waren jedoch nicht funktionell an der Änderung des Wachstumsprofils des dominanten Follikels beteiligt (ADAMS und Mitarb., 1992a).

2.2.3.2 Follikeldynamik und LH

Während das FSH eine große Rolle bei der Initiierung des Follikelwachstums spielt, erlangt das LH nach der Selektion des dominanten Follikels zunehmend an Bedeutung. Große Antralfollikel sind in der Lage, ihre gonadotropen Ansprüche von FSH nach LH zu verlagern, wenn dieses in Pulsen mit hoher Frequenz, aber geringer Amplitude freigesetzt wird (CAMPBELL und Mitarb., 1995). Die Gonadotropinabhängigkeit des selektierten Follikel verschiebt sich demnach so, dass die weitere Entwicklung vom LH gesteuert wird (GINTHER und Mitarb., 1996a; CAMPBELL und Mitarb., 1999). Dies ist offenbar jener Umstand, der es dem präovulatorischen Follikel erlaubt, den Abfall der FSH-Konzentration zu überstehen. Diese Verlagerung der Gonadotropinabhängigkeit steht im Selektionsprozess offenbar an zentraler Stelle (CAMPBELL und Mitarb., 1995; 1999). Im Zeitraum der Wachstumsdifferenzierung verändert sich die Anzahl der FSH-Rezeptoren auf Granulosazellen nicht, während die der LH-Rezeptoren steigt (XU und Mitarb., 1995; BODENSTEINER und Mitarb., 1996). Zum Zeitpunkt der Luteolyse wird der dominante Follikel unter dem wachsenden Einfluss des LH zur Estrogensynthese angeregt. Ist die produzierte Estradiolmenge ausreichend, wird der präovulatorische LH-Gipfel induziert (BAIRD und MCNEILLY, 1981).

Unmittelbar nach dem präovulatorischen LH-Gipfel wurden minimale LH-Konzentrationen beobachtet (SCHALLENBERGER und Mitarb., 1985a; GINTHER und Mitarb., 1998). Die Anzahl der LH-Pulse und das Basalniveau erhöhte sich im Anschluss daran wieder für eine Zeitspanne von etwa 24 Stunden vor bis 24 Stunden nach der Wachstumsdifferenzierung (GINTHER und Mitarb., 1998).

Tabelle 11. Literaturangaben zur Zeitdauer zwischen ausgewählten Ereignissen der Follikelentwicklung

| Ereignis | Zeit | Autor |
|---|------------------------|--|
| Intervall FSH-Anstieg – Auftreten der Follikelreifungswelle | 2 bis 4 Tage | ADAMS und Mitarb., 1992a; SUNDERLAND und Mitarb., 1994 |
| FSH-Maximum – Auftreten der Follikelreifungswelle | 1 bis 2 Tage | ADAMS und Mitarb., 1992a |
| Auftreten einer Follikelreifungswelle bis zur Wachstumsdifferenzierung | 2,5 Tage | GINTHER und Mitarb., 1997, 1998 |
| Selektion des ovulatorischen Follikels - Ovulation | 3 bis 4 Tage | PIERSON und GINTHER, 1988b |
| Intervall zwischen Auftreten der ovulatorischen Reifungswelle und Beginn der Rückbildung des anovulatorischen Follikels | 3 Tage | GINTHER und Mitarb., 1989a |
| Intervall LH-Gipfel - Ovulation | 30 (24 bis 36) Stunden | BERGFELT und Mitarb., 1997 |

Nach der Rückbildung des Gelbkörpers erhöht sich die pulsatile LH-Sekretion zeitgleich mit der Estradiolkonzentration (SCHALLENBERGER und Mitarb., 1985a). BAIRD und MCNEILLY (1981) kamen zu der Auffassung, dass dieser Estradiolanstieg durch den Einfluss der pulsatischen LH-Ausschüttung stimuliert wird. Hinweise für die wachsende Bedeutung des LH in der finalen Phase der Follikelentwicklung liefern auch Untersuchungen von anderen Autoren. Die Unterdrückung der pulsatischen LH-Sekretion mit einem GnRH-Agonisten führt zu einer Stagnation des Wachstums des dominanten Follikels bei einer Größe von 7 bis 9 mm (GONG und Mitarb., 1995). In der Tabelle 11 sind zeitliche Beziehungen zwischen endokrinologischen Ereignissen und Prozessen der Follikelentwicklung dargestellt.

2.2.4 Follikeldynamik und Steroide

2.2.4.1 Follikeldynamik und Estradiol

Estradiol besitzt große Bedeutung für die Entwicklung der Gonadotropinabhängigkeit der Follikel. Es ist an der Regulation der follikulären Steroidbildung beteiligt, indem es einen positiven Effekt zur Steigerung der eigenen Synthese ausübt. Außerdem übt es einen synergistischen Effekt mit FSH auf die Granulosazellproliferation und die Antrumbildung aus. Dies lässt vermuten, dass die Fähigkeit eines Follikels zur Estrogensynthese das Schlüsselereignis ist, welches die Reifung des Follikels in Gang setzt (CAMPBELL und MCNEILLY, 1996). Unterstützt wird diese Hypothese durch die positiven Beziehungen zwischen dem Zustand des Follikels, der Vitalität der Eizelle und der intrafollikulären Estradiolkonzentration (IRELAND und ROCHE, 1983a). Im präovulatorischen Zeitraum, bei geringen Progesteronkonzentrationen, übt Estradiol einen positiven Einfluss auf die LH-Sekretion aus, wodurch der präovulatorische LH-Gipfel zustande kommt. Die passive Immunisierung gegen Estradiol verhindert diesen positiven Rückkopplungsmechanismus auf die LH-Sekretion (KANEKO und Mitarb., 1995).

Selektion und Dominanz sind mit der Steigerung der Fähigkeit der Thekazellen zur Androgenproduktion und der Granulosazellen zur Aromatisierung der Androgene zu Estrogenen verbunden (FORTUNE, 1994). Die Estrogensynthese erfordert also ein präzises Zusammenspiel beider follikulärer Zelltypen und beider Gonadotropine. Die Thekazellen produzieren nach LH-Stimulierung die Androgene, welche in den Granulosazellen anfangs unter FSH-Einfluss, später im Zyklus unter FSH- und LH-Einfluss, zu Estrogenen aromatisiert werden (RICHARDS, 1987). Der dominante Follikel besitzt im Vergleich zu den subordinaten Follikeln eine größere Kapazität zur Synthese und Freisetzung von Estradiol. So steigt die Estrogenproduktion nach der Wachstumsdifferenzierung und während der Entwicklung eines präovulatorischen Follikels an (PADMANABHAN und Mitarb., 1984; BODENSTEINER und Mitarb., 1996). Infolgedessen erhöht sich in der Wachstumsphase des dominanten Follikels die Estrogenkonzentration sowohl in der Follikelflüssigkeit als auch im Blut (BADINGA und Mitarb., 1992). Dies scheint in der Phase der Wachstumsdifferenzierung für die Dominanz über die untergeordneten, subordinaten Follikel von besonderer Bedeutung zu sein.

Es spielt bei der anhaltenden Unterdrückung des FSH und bei der Umstellung des Follikels auf die LH-Abhängigkeit eine wichtige Rolle (BODENSTEINER und Mitarb., 1996; GINTHER und Mitarb., 1996a).

Beim Rind übt Estradiol gemeinsam mit Inhibin einen synergistischen Effekt bei der Hemmung der FSH-Sekretion in der follikulären Phase aus (KANEKO und Mitarb., 1995). Es wurde darüber hinaus eine zeitliche Beziehung zwischen dem Anstieg von Estradiol in der Vena cava und dem Abfall von FSH in der Jugularvene beschrieben (EVANS und Mitarb., 1997). GIBBONS und Mitarb. (1999) konnten jedoch eine solche zeitliche Verbindung nicht nachweisen.

Die Estradiolkonzentration steigt im präovulatorischen Zeitraum etwa bis zum Zeitpunkt des LH-Gipfels. Setzt die Luteolyse ein, bewirkt, wie bereits beschrieben, eine ausreichend hohe Estrogenkonzentration den LH-Gipfel (BAIRD und MCNEILLY, 1981; FORTUNE und Mitarb., 1988; BO und Mitarb., 1995). Danach kommt zu einem Abfall der Estradiolkonzentrationen und zu einem Ansteigen des Progesterons (FORTUNE und Mitarb., 1988).

Auch während der Lutealphase können Anstiege der Estradiolkonzentration im Blut beobachtet werden (KOTWICA und WILLIAMS, 1982; SCHALLENBERGER und Mitarb., 1985a; SPICER und ECHTERNKAMP, 1986). Im folgenden sollen diese Ereignisse hinsichtlich der Zeit ihres Auftretens und der Stärke ihrer Ausprägung näher charakterisiert werden:

Die Estradiolkonzentration stieg signifikant zwischen 48 und 12 Stunden vor dem LH-Gipfel und fiel anschließend wieder im Zeitraum von 12 Stunden vor bis 48 Stunden nach dem LH-Gipfel. Danach stieg sie erneut zwischen 48 und 72 Stunden und zwischen 84 und 120 Stunden nach dem LH-Gipfel (BERGFELT und Mitarb., 1997). Die mit dem präovulatorischen LH-FSH-Gipfel einhergehende Estradiolerhöhung war jedoch stärker als die folgenden, was die Annahme unterstützt, dass Estradiol an der Modulation der Höhe der FSH-Ausschüttung beteiligt ist (BERGFELT und Mitarb., 1997). WALTERS und SCHALLENBERGER (1984) beobachteten Maxima der Konzentration von Estradiol 6 bis 8 Stunden vor dem LH-Gipfel und im Zeitraum des LH-Gipfels. Dabei korrelierte die erreichte Höhe positiv mit der LH-Maximalkonzentration (WALTERS und SCHALLENBERGER, 1984). Während der Wachstumsphase des dominanten Follikels wurde ebenfalls eine Erhöhung der Estrogenkonzentration festgestellt (am Tag 2,5 nach der Ovulation: RHODES und Mitarb., 1995; am Tag 4 nach der Brunst: WALTERS und Mitarb., 1984). Pulsamplitude und Basalkonzentration von Estradiol waren während der Wachstumsphase des dominanten Follikels am größten und wurden in der Plateauphase, als der dominante Follikel seinen Maximaldurchmesser erreichte, signifikant verringert (RHODES und Mitarb., 1995). Die Steigerung der Estradiolsekretion war mit einem Anstieg der LH-Pulsanzahl verbunden. Dies lässt vermuten, dass die Estradiolproduktion auch von der LH-Pulsatilität beeinflusst wird (WALTERS und Mitarb., 1984; RHODES und Mitarb., 1995).

In einer anderen Studie wurde am Tag 1 und zwischen den Tagen 7 und 10 eine geringe Estradiolkonzentration in der Vena cava caudalis festgestellt (EVANS und Mitarb., 1997). Am Tag 9 lag die basale E_2 -Konzentration bei 4,4 pg/ml (RHODES und Mitarb., 1995). Demgegenüber erfolgten zwischen den Tagen 4 und 6 sowie 12 und 13 Erhöhungen der Estradiolkonzentration. Im Verlauf der ersten Follikelreifungswelle wurde am Tag 5 die vergleichsweise höchste Konzentration beobachtet (EVANS und Mitarb., 1997). Der Abfall

der Estradiolkonzentration setzte noch vor dem Ende des Wachstums des dominanten Follikels ein (BADINGA und Mitarb., 1992; RHODES und Mitarb., 1995; EVANS und Mitarb., 1997).

2.2.4.2 Follikeldynamik und Progesteron

Progesteron ist aufgrund seiner negativen Feedback-Wirkung auf die LH-Ausschüttung das Schlüsselhormon für die Bestimmung der Zykluslänge. Dieser negative Feedback-Mechanismus wird durch die Unterdrückung der GnRH-Ausschüttung über neuronale hemmende Vorgänge realisiert. Die Vermittlung dieses Effektes erfolgt vermutlich durch die Frequenz der episodischen LH-Ausschüttungen. (IRELAND und ROCHE, 1982a; CLARKE und Mitarb., 1983). Der negative Feedback-Mechanismus des Progesterons auf das LH wird durch Estradiol verstärkt (BURKE und Mitarb., 1996). Progesteron unterdrückt das Follikelwachstum in Abhängigkeit von der Dosis und übt somit einen Einfluss auf das Auftreten der folgenden Follikelreifungswelle aus (ADAMS und Mitarb., 1992b; BURKE und Mitarb., 1994).

Bei zyklischen Rindern beginnen die Progesteronkonzentrationen etwa am vierten (1. bis 5.) Tag nach der Ovulation zu steigen, erreichen am Tag 10 (8 bis 11) ein Plateau und fallen am Tag 17/18 wieder, um auf das Basalniveau ($< 1 \text{ ng / ml}$) zurückzukehren (SCHAMS und Mitarb., 1977; KOTWICA und WILLIAMS, 1982; Werte in Klammern aus: MIHM und Mitarb., 1996). Ein hohes Progesteronniveau (2 bis 10 ng/ml, Lutealphase) korrespondiert mit einem Absinken der LH-Pulsfrequenz. Dies führt zum Turnover des dominanten Follikels (SAVIO und Mitarb., 1993). Ein dominanter Follikel der ersten Follikelreifungswelle ovuliert aufgrund der hohen Progesteronkonzentrationen im betreffenden Zyklusstadium nicht. Wird jedoch am Zyklustag 7 die Luteolyse induziert, so ovulierten 80 % der dominanten Follikel der ersten Reifungswelle im Zeitraum von 48 bis 120 Stunden nach der Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$ (SAVIO und Mitarb., 1990). Bei einem dreiwelligen Follikelwachstum hatte der zweite anovulatorische dominante Follikel bei einer höheren Progesteronkonzentration einen geringeren Maximaldurchmesser als der anovulatorische Follikel der ersten Reifungswelle. Desweiteren ist das Auftreten einer dritten Follikelreifungswelle mit einer verlängerten Lebensdauer des Gelbkörpers verbunden (GINTHER und Mitarb., 1989b).

In der Abbildung 5 sind die Ereignisse bei einem zweiwelligen Follikelwachstumsverlauf zusammenfassend dargestellt. In dem Milieu niedriger Konzentrationen von Estradiol und Progesteron am Tag 1 des Zyklus stimuliert ein FSH-Anstieg das Auftreten der ersten Follikelreifungswelle (ADAMS und Mitarb., 1992a; SUNDERLAND und Mitarb., 1994; GONG und Mitarb., 1995). Mit dem Wachstum des dominanten Follikels und des Gelbkörpers steigt die periphere Estradiol- und Progesteronkonzentration und übt einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf die FSH-Konzentration aus. Nach dem Erreichen des Maximums der Estradiolsekretion (etwa am Tag 4) setzt der dominante Follikel bei basalen FSH-Konzentrationen sein Wachstum fort (ADAMS und Mitarb., 1992a; SUNDERLAND und Mitarb., 1994; RHODES und Mitarb., 1995; EVANS und Mitarb., 1997). Gleichzeitig herrscht - infolge der gesteigerten Progesteronkonzentration - ein sinkendes LH-Basalniveau und eine sinkende LH-Pulsanzahl bei steigender LH-Amplitude vor. Das Ansteigen der Anzahl der

LH-Rezeptoren (IRELAND und ROCHE, 1983a; XU und Mitarb., 1995) ermöglicht es dem Follikel, auf die höhere LH-Pulsamplitude mit fortgesetztem Wachstum zu reagieren. Die FSH-Konzentration bleibt - infolge der hohen Androgenkonzentration - gering (EVANS und Mitarb., 1997).

Etwa am Tag 8 erreicht der dominante Follikel unter dem Einfluss der hohen Androgenproduktion eine statische Phase. Mit Fortbestehen dieser statischen Phase sinkt die Androgensekretion, wodurch die Konzentration von FSH wieder steigen kann (EVANS und Mitarb., 1997). Dadurch wird das Auftreten einer neuen Follikelreifungswelle (etwa am Tag 11) stimuliert (ADAMS und Mitarb., 1992a; SUNDERLAND und Mitarb., 1994; GONG und Mitarb., 1995; EVANS und Mitarb., 1997). Die LH-Pulsamplitude wird während des Estradiolanstiegs reduziert (EVANS und Mitarb., 1997). Estradiol und die steigende Androgenkonzentration bewirken erneut die Unterdrückung des zirkulierenden FSH. Diese zyklischen Veränderungen der Steroid- und Gonadotropinkonzentrationen bewirken das wellenförmige Follikelwachstum und laufen so lange ab, bis infolge der Wirkung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ etwa ab Tag 15 bzw. 16 die Luteolyse stattfindet und ein dominanter Follikel ovuliert.

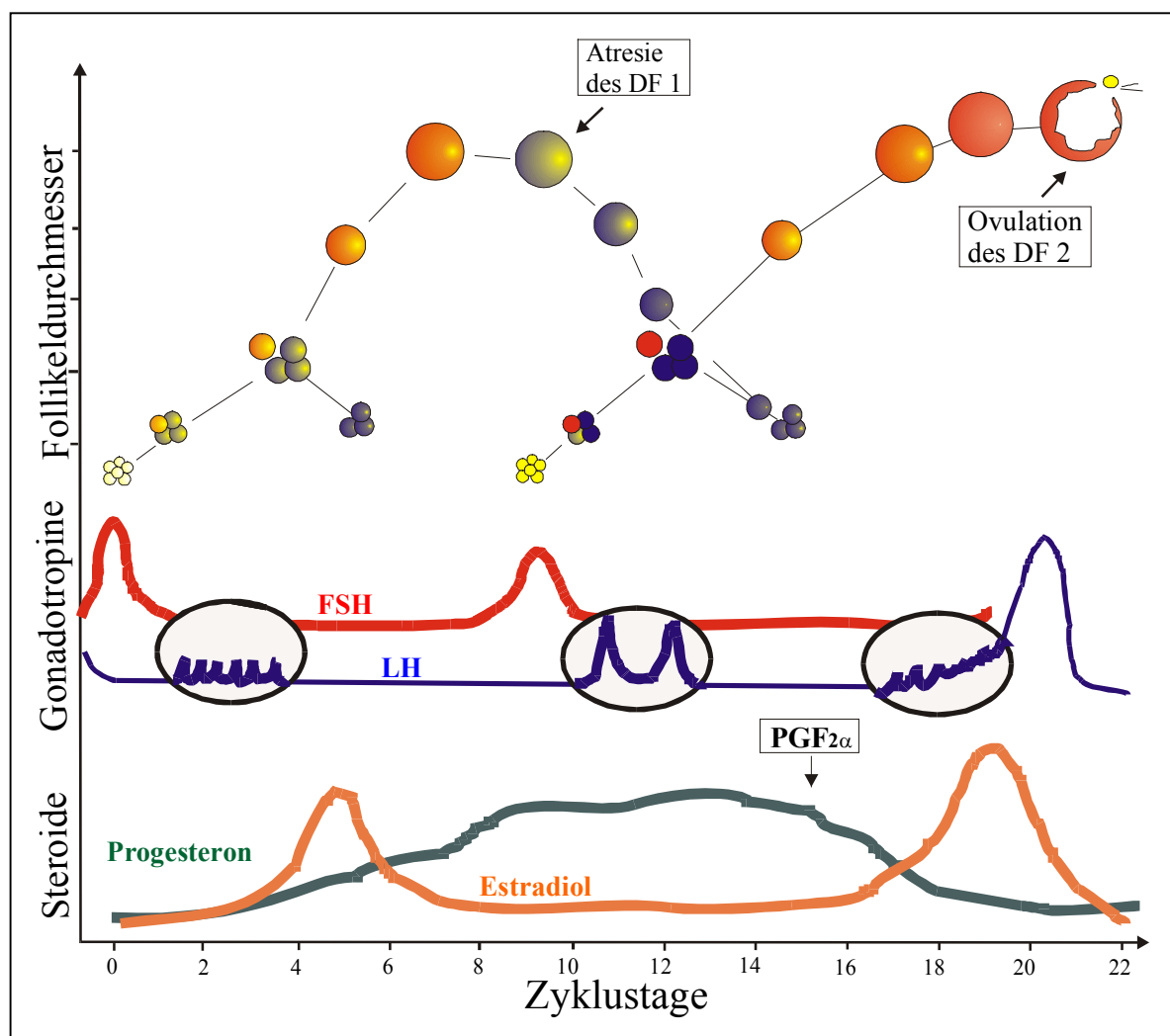


Abbildung 5. Schema endokriner und follikulärer Prozesse im Verlauf eines Zyklus mit zwei Follikelreifungswellen.

2.3 Einsatz von GnRH und seinen Agonisten

Für den klinischen Einsatz von GnRH und dessen Agonisten gibt es verschiedene Möglichkeiten (Abbildung 6). Einerseits kann bei GnRH-defizienten Individuen die Fertilität durch intermittierende (pulsatile) Gabe von GnRH wiederhergestellt werden und andererseits kann die Hypophysen-Keimdrüsen-Achse durch GnRH-Agonisten reversibel supprimiert werden. Die letztgenannte Anwendung, „biochemische Kastration“, erfordert eine dauerhafte GnRH-Administration oder den Einsatz langzeitaktiver GnRH-Analoga (CONN und CROWLEY, 1991; D'OCCHIO und Mitarb., 2000). Außerdem können GnRH-Analoga im Rahmen zyklussteuernder Maßnahmen zur Brunstsynchronisation, zur Ovulationsinduktion, zur Stimulation der Gelbkörperentwicklung, zur Verzögerung der Gelbkörperrückbildung und zur Beeinflussung von Follikelzysten angewandt werden (THATCHER und Mitarb., 1993; DE RENSIS und PETERS, 1999; HOOIJER und Mitarb., 1999). In einer jüngeren Studie konnte im Gegensatz zu zahlreichen anderen Ergebnissen keine therapeutische Beeinflussung von Follikelzysten durch die Anwendung eines GnRH-Analogs nachgewiesen werden (JOU und Mitarb., 1999). Die Abbildung 6 verdeutlicht die möglichen Wirkungen beim Einsatz von GnRH-Agonisten.

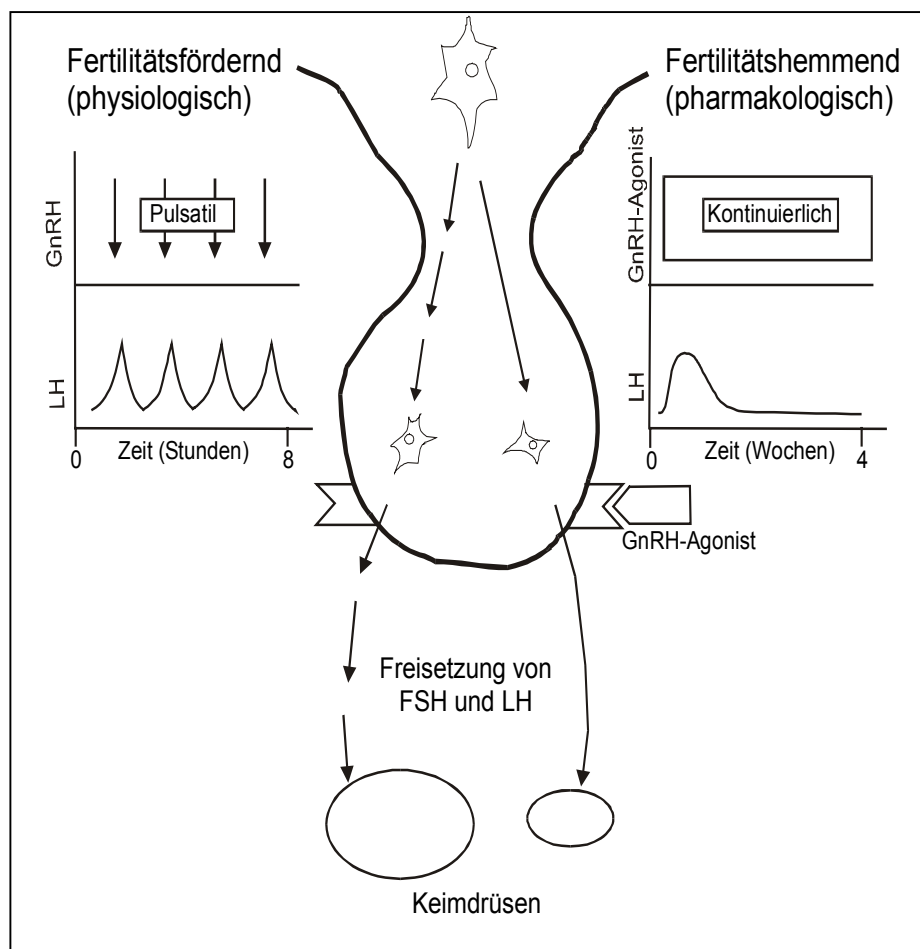


Abbildung 6.

Wirkungsweise von GnRH und dessen Analoga in langzeitaktiver Form (modifiziert nach CONN und CROWLEY, 1991). Die physiologische oder pulsatile Gabe von GnRH oder dessen Agonisten simuliert die endogene GnRH-Sekretion des Hypothalamus (linke Seite). Die kontinuierliche Applikation von GnRH oder dessen Agonisten (rechte Seite) führt zur reversiblen Suppression der Achse Hypothalamus - Hypophyse - Ovar.

2.3.1 Wirkungsweise der GnRH-Agonisten

Auf der Basis von Rezeptorbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass sehr geringe Dosen von GnRH und GnRH-Agonisten die Anzahl der frei verfügbaren GnRH-Rezeptoren auf der Hypophysenzelloberfläche vermehren (CLAYTON, 1989). Die Bindung des GnRH oder eines GnRH-Agonisten an den Rezeptor resultiert in Mikroaggregation des Hormon-Rezeptorkomplexes in der Hypophysenzellmembran. Nachfolgend kommt es zur Einverleibung dieses Komplexes in die Zelle. Dieser Vorgang wird als Internalisierung bezeichnet. Anschließend erfolgt die Aufspaltung durch intrazelluläre lysosomale Enzyme. Der Verlust der Rezeptoren durch die Internalisierung kann durch die Neusynthese des Rezeptorproteins nicht so rasch kompensiert werden, und somit nimmt die Rezeptorkonzentration deutlich ab (Down-Regulation; KIESEL und RUNNEBAUM, 1992). Die chronische Wirkung der GnRH-Agonisten scheint neben der Down-Regulation der membranständigen GnRH-Rezeptoren auch die Hemmung von Postrezeptormechanismen zu beinhalten. Experimente mit kultivierten Hypophysenzellen zeigten ferner, dass die Proteinkinase C, ein für die Gonadotropinsynthese und -sekretion bedeutsames Enzym, bei der Desensibilisierung der Hypophyse durch GnRH-Agonisten beeinflusst wird (KIESEL und RUNNEBAUM, 1992). Beim Menschen kam es unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten zu einem Abfall des Gehaltes an bioaktivem GnRH, während der Gehalt des immunoaktiven GnRH deutlich stieg (KIESEL und RUNNEBAUM, 1992). Die antigonadotrope Wirkung der GnRH-Agonisten, die nach einem kurzzeitigen stimulierenden Effekt einsetzt, ist in Tabelle 12 zusammengestellt. Die langfristige Blockade der Hypophyse, die zu einem hypogonadotropen und nachfolgend hypogonadalen Zustand führt, hält während der Therapie an und ist reversibel (KIESEL und RUNNEBAUM, 1992).

Tabelle 12. Kurz- und Langzeitwirkung der GnRH-Analoga (KIESEL und RUNNEBAUM, 1992)

| | |
|--|---|
| <i>1. Phase: Kurzfristige Stimulation der Gonadotropinsekretion</i> | |
| Mechanismen | Erhöhung der GnRH-Rezeptorzahl (Up-Regulation) Stimulation der intrazellulären Postrezeptormechanismen (=second messenger) |
| Dauer | Wenige Tage |
| <i>2. Phase: Langfristige, aber reversible Hemmung der Gonadotropinsekretion</i> | |
| Mechanismen | Starke Verminderung der GnRH-Rezeptorzahl, somit Fehlen der endogenen GnRH-Wirkung (=Down-Regulation) Hemmung der intrazellulären Postrezeptormechanismen (=Desensitivierung) Abnahme der Bioaktivität von Gonadotropinen |
| Dauer | Suppression hält während der Therapie an, Reversibilität nach Absetzen der Therapie |

Durch die kontinuierliche Wirkung von GnRH-Agonisten kommt es zu folgenden Veränderungen an den gonadotropen Hypophysenzellen (CONN und Mitarb., 1984; LOUMAYE und Mitarb., 1990; CONN und CROWLEY, 1991):

1. Reduzierung der Anzahl der GnRH-Rezeptoren (Down-Regulation)
2. Entkopplung von Rezeptor- und GTP-bindendem Protein
3. Abnahme der LH- β -mRNA, Anstieg des Gehaltes an LH- α -mRNA
4. Reduzierung des hypophysären LH-Gehaltes und Steigerung von Synthese und Freisetzung der LH- α -mRNA
5. Reduktion der LH-Bioaktivität durch veränderte posttranslationale Glykosylierung.

Die Reduktion des GnRH-Rezeptorgehaltes nach chronischer Applikation eines GnRH-Agonisten geht gleichzeitig mit einer Reduktion der mRNA für den GnRH-Rezeptor und einer Verringerung der GnRH-stimulierten LH-Sekretion einher. So konnte, wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben wurde, bei kastrierten männlichen Schafen durch die wiederholte Gabe eines GnRH-Agonisten der Gehalt an GnRH-Rezeptor-mRNA um 84-89 % gesenkt werden (WU und Mitarb., 1994). Demgegenüber ist Estradiol in der Lage, den negativen Einfluss des GnRH (homologe Desensibilisierung) durch die Stimulation der GnRH-Rezeptor-mRNA und der GnRH-Rezeptorkonzentration außer Kraft zu setzen (TURZILLO und Mitarb., 1998).

Bei kastrierten männlichen Rindern wurde unter dem Einfluss von Deslorelin (GnRH-Agonist, Nonapeptid) eine signifikante Verringerung der mRNA sowohl für die LH β -Untereinheit, als auch für die FSH β -Untereinheit gefunden (ASPDEN und Mitarb., 1996). Diese Ergebnisse verdeutlichen die direkte Einflussnahme des GnRH auf die Genexpression der β -Untereinheiten beider Gonadotropine ohne Beteiligung des gonadalen Feedback-Mechanismus.

2.4 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten

Über die Nutzung von GnRH-Agonisten zur weiteren Aufklärung der Rolle der Gonadotropine FSH und LH für ovarphysiologische Prozesse ist in der jüngeren Vergangenheit wiederholt berichtet worden (GONG und Mitarb., 1995; GONG und Mitarb., 1996; BERGFELD und Mitarb., 1996a; D'OCCHIO und Mitarb., 1996). Im Rahmen der Arbeiten kamen verschiedene GnRH-Agonisten zum Einsatz, wie beispielsweise **Deslorelin** (BERGFELD und Mitarb., 1996a; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; MACLELLAN und Mitarb., 1997; AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998), **Buserelin** (MACMILLAN und THATCHER, 1991; MC LEOD und Mitarb., 1991; GONG und Mitarb., 1995; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; GONG und Mitarb., 1996; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998) oder **Leuprolid** (HOTTA und Mitarb., 1995).

Eine **chronische Applikation** der Agonisten wird über verschiedene Formulierungen bzw. Behandlungsschemata realisiert. Dazu zählen wiederholte Injektionen des Wirkstoffes (1 bis 2 Injektionen/24 Stunden; MC LEOD und Mitarb., 1991; GONG und Mitarb., 1995), die Implantation von Minipumpen (GONG und Mitarb., 1996) oder das Applizieren von Implantaten mit kontinuierlicher Wirkstofffreisetzung (BERGFELD und Mitarb., 1996a; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; MACLELLAN und Mitarb., 1997; AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998).

2.4.1 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten und Follikelentwicklung

Der Einfluss von GnRH-Agonisten auf die Ovarprozesse ist abhängig vom Zyklusstadium zum Zeitpunkt der Applikation. Die Wirkungsausprägung wird von der Dosis, der Häufigkeit der Applikation und der Potenz des jeweils verwendeten GnRH-Agonisten beeinflusst (THATCHER und Mitarb., 1993). Bei Applikation im periovulatorischen Zeitraum erfolgt aufgrund des induzierten LH-Anstieges die Ovulation des oder der dominanten Follikel (AMBROSE und Mitarb., 1998).

Eine Verlängerung der Zyklusdauer (MILVAE und Mitarb., 1984) bzw. der Lebensdauer des Corpus luteum (MACMILLAN und Mitarb., 1985) wurde bereits nach einmaliger Applikation von GnRH-Agonisten in der Gelbkörperphase beobachtet. Einige Autoren stellen eine Einstellung der zyklischen Östrusaktivität von dosisabhängiger Dauer fest (HOTTA und Mitarb., 1995; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Eine chronische Behandlung mit GnRH-Agonisten während der Lutealphase verhindert den präovulatorischen LH-Anstieg und die Ovulation, ein Effekt, der durch die Down-Regulation der gonadotropen Hypophysenfunktion zu erklären ist (D'OCCHIO und Mitarb., 1989; MC LEOD und Mitarb., 1991; GONG und Mitarb., 1995; BERGFELD und Mitarb., 1996a). AMBROSE und Mitarb. (1998) stellten eine Verzögerung des Erscheinens des dominanten Follikels der ersten Reifungswelle in der Größenklasse über 9 mm fest. Bis zum Tag 13 hatte die Mehrzahl der behandelten Tiere keine Follikel dieser Größe.

GONG und Mitarb. (1995; 1996) beschreiben hingegen die erste Follikelreifungswelle unter dem chronischen Einfluss des GnRH-Analogons als normal, gekennzeichnet durch das Auftreten und die Regression eines dominanten Follikels. Der dominante Follikel der zweiten Reifungswelle wuchs nur bis maximal 7 bis 9 mm heran und stagnierte dann im Wachstum. Er kam nicht zur Ovulation, obwohl die FSH-Konzentration entsprechend des Verlaufes der Follikelreifungswelle anstieg. Andere Autoren wiesen diese Wachstumsstagnation des dominanten Follikels bei einem Teil der behandelten Tiere ebenfalls nach (AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Desweiteren wurde eine Verzögerung der Rekrutierung und Entwicklung des dritten dominanten Follikels unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten festgestellt (RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998).

GONG und Mitarb. (1996) beobachteten, dass eine Verabreichung von Buserelin über Minipumpen (2,5 µg/h) am Zyklustag 5 bei Jungrindern eine Ovulation induziert, was auf den initialen LH-Gipfel und das Vorhandensein eines ovulationskompetenten Follikels zurückzuführen ist.

Eine Hemmung des Follikelwachstums bei Kälbern findet nach längerer Behandlung (48 µg Leuprorelin, zweimal täglich, s.c. Injektion über 23 Tage) ihren Ausdruck in einer Erhöhung des Anteils von Follikeln < 3 mm (DUFOUR und Mitarb., 1997). Bei weiblichen *Bos indicus*-Kälbern wurde nach 8-tägiger Behandlung (50 µg Deslorelin/24 Stunden) kein Einfluss auf Anzahl und Größe der vorhandenen Follikel festgestellt (MACLELLAN und Mitarb., 1997). In anderen Studien war die Anzahl mittelgroßer (6 bis 9 mm) und größer (> 9 mm) Follikel unter dem Einfluss eines langzeitaktiven GnRH-Agonisten signifikant geringer als bei den Kontrolltieren (AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Jedoch traten bei den behandelten Tieren signifikant mehr kleine Follikel (2 bis 5 mm) auf (AMBROSE und Mitarb., 1998).

2.4.2 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten und Gonadotropinsekretion

Die Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten verursacht *in vivo* ein biphasisches Verhalten der Gonadotropinsekretion. In der ersten, stimulatorischen Phase kommt es zu einer initialen Gonadotropinausschüttung (Flare-up-Effekt). Die zweite Phase ist durch eine Hemmung der Gonadotropinsekretion (SANDOW und Mitarb., 1978), welche etwa 7 bis 14 Tage nach Applikation des GnRH-Agonisten beginnt, gekennzeichnet (CONN und CROWLEY, 1991).

Übereinstimmend wird das Auftreten eines **initialen LH-Anstieges** innerhalb weniger Stunden nach Applikation des GnRH-Analogons bei weiblichen Rindern beschrieben (D'OCCHIO und Mitarb., 1989; GONG und Mitarb., 1995; BERGFELD und Mitarb., 1996a; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; D'OCCHIO und ASPDEN, 1996; GONG und Mitarb., 1996; ASPDEN und Mitarb., 1997; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998).

Unterschiedliche Aussagen werden zum nachfolgenden LH-Verlauf gemacht. Anfänglich wurde oft eine Erhöhung des Basalniveaus für zwei bis sieben Tage beobachtet (GONG und Mitarb., 1995; BERGFELD und Mitarb., 1996a; D'OCCHIO und Mitarb., 1996). Für den Zeitraum danach wurden von einigen Autoren keine Unterschiede zwischen den LH-Basalniveaus behandelter und unbehandelter Tiere beschrieben (präpubertale Rinder: BERGFELD und Mitarb., 1996a; weibliche Jungrinder: GONG und Mitarb., 1996). Andere Autoren fanden unter Wirkung eines GnRH-Agonisten erhöhte (D'OCCHIO und Mitarb., 1989; GONG und Mitarb., 1995) oder verringerte (MEE und Mitarb., 1993; GONG und Mitarb., 1996) LH-Basalkonzentrationen. Auch beim Menschen wurden verringerte LH-Basalkonzentrationen unter dem Einfluss von GnRH-Agonisten beobachtet (GENAZZANI und Mitarb., 1996).

Die Aufhebung der Pulsatilität der LH-Ausschüttung unter dem Langzeit-Einfluss von GnRH-Agonisten ist sowohl bei weiblichen Jungrindern (GONG und Mitarb., 1995, GONG und Mitarb., 1996) als auch bei weiblichen Kälbern (MACLELLAN und Mitarb., 1997) festgestellt worden. MC NEILLY und FRASER (1987) fanden eine Aufhebung der pulsilen LH-Ausschüttung bei Schafen, die einen GnRH-Agonisten über eine osmotische Minipumpe verabreicht bekamen. Beim Menschen wurde ebenfalls die Unterdrückung der pulsilen LH-Sekretion beschrieben (GENAZZANI und Mitarb., 1996).

Ein initialer Anstieg der **FSH-Konzentrationen** nach Applikation eines GnRH-Agonisten wird von GONG und Mitarb. (1995), HOTTA und Mitarb. (1995), GONG und Mitarb. (1996) beschrieben. Andere Autoren (MC LEOD und Mitarb., 1985; D'OCCHIO und Mitarb., 1989) fanden jedoch keine Unterschiede bezüglich der FSH-Basalkonzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im nachfolgenden Verlauf der FSH-Basalkonzentrationen kam es bei den Untersuchungen von GONG und Mitarb. (1995, 1996) zu einer Erhöhung der basalen FSH-Konzentrationen. Erst nach längerer Einwirkung des GnRH-Agonisten (am Tag 31-33 der Behandlung mit Hilfe einer Minipumpe) fielen die FSH-Basalwerte signifikant unter die Werte der Kontrolltiere (GONG und Mitarb., 1996).

Über den Einfluss von GnRH-Agonisten auf die Pulsatilität der FSH-Sekretion beim Rind konnten in der Literatur keine Hinweise gefunden werden. Beim Menschen wurde unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten weiterhin eine pulsatile FSH-Ausschüttung festgestellt, jedoch mit verringerten Pulsamplituden (GENAZZANI und Mitarb., 1996).

Das unterschiedliche Verhalten der Gonadotropinsekretion in den einzelnen Studien könnte auf die unterschiedlichen Behandlungsprotokolle (Dosis, Frequenz, Dauer), unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte und unterschiedliche Analysemethoden zurückzuführen sein. Bei Rindern könnte nach Auffassung von GONG und Mitarb. (1996) eine längere Behandlungsdauer erforderlich sein, um eine komplette Down-Regulation der gonadotropen Hypophysenfunktion zu erzielen.

2.4.3 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten und Steroidhormonsekretion

Die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen haben gezeigt, dass GnRH wahrscheinlich keinen direkten stimulierenden oder hemmenden Einfluss auf die Progesteronsynthese des Corpus luteum hat (THATCHER und Mitarb., 1993; TWAGIRAMUNGU und Mitarb., 1995b). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass sowohl bei bovinen Gelbkörperzellen (IRELAND und Mitarb., 1990), als auch generell im bovinen Ovargewebe (BROWN und REEVES, 1983) keine spezifischen GnRH-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten.

Kurzzeitige Erhöhungen der **Progesteronkonzentration** nach Applikation von GnRH und GnRH-Agonisten sind schon von einer Reihe von Autoren beschrieben worden (THATCHER und Mitarb., 1993; TWAGIRAMUNGU und Mitarb., 1995a). HOTTA und Mitarb. (1995) wiesen nach einmaliger Applikation von Leuprolid (GnRH-Agonist) in der Mitte des Zyklus bei behandelten Tieren über zwei Wochen erhöhte Progesteronkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrolltieren nach. Es kann angenommen werden, dass diese Progesteronerhöhungen auf die Umwandlung kleiner Luteinzellen in große infolge des durch die GnRH-Wirkung freigesetzten LH zurückzuführen sind (HANSEL und Mitarb., 1991). Unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten kommt es offenbar zu einer Erhöhung des Anteils großer Luteinzellen, während die Anzahl kleiner Luteinzellen im Gelbkörper sinkt (MEE und Mitarb., 1993; TWAGIRAMUNGU und Mitarb., 1995b). Ein stimulierender Effekt auf endogene Corpora lutea wurde auch von anderen Autoren beschrieben (MILVAE und Mitarb., 1984; BAIRD, 1992; RAJAMAHENDRAN und SIANANGAMA, 1992; MANN und Mitarb., 1995).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch die Langzeitbehandlung mit GnRH-Agonisten bei Jungrindern mit einem vorhandenen Gelbkörper zu einer erhöhten Progesteronsekretion führen kann (BERGFELD und Mitarb., 1996a; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Bei Kühen wird auch nach Verabreichung des langzeitaktiven GnRH-Agonisten im periovulatorischen Zeitraum eine gesteigerte Progesteronsynthese beschrieben (AMBROSE und Mitarb., 1998). Als Ursache wird auch hier die erhöhte LH-Konzentration nach Applikation des GnRH-Agonisten diskutiert, die offenbar die Ausbildung eines leistungsfähigeren Gelbkörpers stimuliert (AMBROSE und Mitarb., 1998).

Bezüglich der Estradiolkonzentration konnten in der Literatur folgende Angaben gefunden werden: Präpubertale Jungrinder wiesen unter dem Einfluss eines langzeitaktiven GnRH-Agonisten erhöhte Konzentrationen von **Estradiol-17 β** auf. Außerdem erfolgte innerhalb von 24 Stunden ein initialer Anstieg und darauffolgend der Rückgang bis auf das Basalniveau.

Zyklische Fluktuationen dieses Hormones, die scheinbar an das Follikelwachstum und die Follikelregression gekoppelt waren, sind ebenfalls beschrieben worden (BERGFELD und Mitarb., 1996a).

2.4.4 Langzeitapplikation von GnRH-Agonisten und Reaktivität der Hypophyse

Übereinstimmend wird darüber berichtet, dass Hypophysen unter dem Langzeiteinfluss eines GnRH-Agonisten auch nach Behandlungsende für eine gewisse Zeit refraktär gegenüber exogen zugeführtem GnRH bleiben. Unter dem chronischen Einfluss von Deslorelin zeigten weder unkastrierte noch kastrierte männliche Rinder nach Stimulation mit einem weiteren GnRH-Agonisten einen Anstieg der LH-Konzentrationen (D'OCCHIO und ASPDEN, 1996). ASPDEN und Mitarb. (1996) wiesen an Ochsen bei wöchentlichen Gaben von GnRH stets eine nachfolgende LH-Konzentrationserhöhung nach, während bei Tieren unter dem Einfluss von Deslorelin ab Tag 14 keine GnRH-induzierte LH-Konzentrationserhöhung mehr stattfand.

Differenzen gibt es jedoch bei den Angaben zur Dauer dieses Zustandes verminderter Reaktivität der Hypophyse. BERGFELD und Mitarb. (1996a) geben für präpubertale Rinder, die unter dem Einfluss von 300µg Deslorelin/Tag standen, einen Zeitraum von zwölf Tagen an. Für Bullen wurde bei 200µg Deslorelin/Tag mindestens eine Periode von 20 Tagen nach Behandlungsende ermittelt (BERGFELD und Mitarb. 1996b). D'OCCHIO und Mitarb. (1996) beobachteten 22 Tage nach der Entfernung der GnRH-Implantate eine Wiederaufnahme der Ovaraktivität bei Rindern. GONG und Mitarb. (1995) beschrieben, dass sieben Tage nach Behandlungsende der im Wachstum stagnierte, dominante Follikel sein Wachstum fortsetzte und ovulierte. In diesem Zusammenhang kam es sechs Tage nach Abschluss einer 21-tägigen GnRH-Agonist-Behandlung zu einem präovulatorischen LH-Anstieg. Im Zeitraum von 8 bis 11 Tagen nach Entfernung von Minipumpen fanden GONG und Mitarb. (1996) ein erneutes Einsetzen der Follikelreifungswellen. Diese Beobachtungen sind Anzeichen dafür, dass nach einer bestimmten Zeit nach Beendigung der Behandlung die Synthese und Freisetzung der Gonadotropine sowohl für das Follikelwachstum als auch für die Ovulation ausreichend ist. Es gibt in der Literatur keine quantitativen Angaben über den Verlauf der Konzentration der hypophysären GnRH-Rezeptoren beim Rind unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Tiere, Material und Methoden

3.1.1 Tiermaterial und Tiervorbereitung

Für die Untersuchungen wurden zyklische Jungrinder der Rasse Deutsche Holstein im Alter von 15 bis 22 Monaten und mit einer Körpermasse zwischen 370 und 450 kg verwendet. Die Aufstallung erfolgte in Anbindehaltung im Versuchstierstall des FBN Dummerstorf auf Gummimatten. Die Stallanlage verfügt über ein Güllekanalentmistungssystem. Zweimal täglich wurden die Tiere mit einer bedarfsorientierten Ration aus Grünfutter bzw. Silage und Kraftfutter gefüttert. Trinkwasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

Bei den zur Auswahl stehenden Tieren wurde zweimal täglich eine fachgerechte Brunstbeobachtung über etwa 10 Minuten durchgeführt. Es kamen ausnahmslos klinisch gesunde Tiere mit regelmäßigen Interöstrusintervallen zum Einsatz. Mit dem Ziel, eine nachfolgende Synchronität des Zyklus zu erreichen, erhielten diese Tiere nach klinischer und ultraschallgestützter transrektaler Feststellung eines Corpus luteum zwischen den Zyklustagen 10 und 14 eine einmalige intramuskuläre (i.m.) Injektion von 0,5 mg Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}; Cloprostenol[®], Jenapharm, Deutschland) zur Induktion der Luteolyse. Der Tag der Injektion von PGF_{2α} ist jeweils Tag -3 im Versuchsablauf.

3.1.2 Katheterisierung und Blutentnahme

Zum Zweck einer regelmäßigen, stressarmen Blutentnahme erfolgte drei bis vier Tage vor Beginn der Untersuchungen die Katheterisierung der *Vena cava caudalis* (hintere Hohlvene) über die *Vena coccygea* (Schwanzvene). In der Abbildung 7 ist die anatomische Situation dargestellt. Es gelangten Polyethylen-Katheter mit einem inneren Durchmesser von 0,75 mm und einem Außendurchmesser von 1,3 mm zum Einsatz. Die Länge der Katheter von der Katheterspitze bis zur Stelle des Eintritts in die Vene betrug 60 bis 65 cm. Diese Abmessung ist geeignet, ovarielle Sekretionsrhythmen der Steroide zu erfassen, da die Katheterspitze im Areal unmittelbar kranial der Abzweigungen der *Venae ovaricae* (Ovarvenen) von der *Vena cava caudalis* platziert werden kann (SCHALLENBERGER, 1990). Die Sedierung der Tiere erfolgte mit einer i.m. Injektion von 54,2 mg Acepromazinmaleat pro Tier (4,0 ml Vetranquil[®] 1 %, Albrecht, Deutschland) wahlweise mit 4 mg Detomidinhydrochlorid pro Tier i.v. (0,4 ml Domosedan[®], Farnos, Finnland). Zusätzlich wurde eine tiefe Epiduralanästhesie mit 80 mg Lidocain pro Tier (4,0 ml Ursocain[®] 2 %, Serum-Werk Bernburg, Deutschland) vorgenommen. Nach gründlicher Reinigung und Desinfektion des Operationsgebietes erfolgt ein etwa 4 cm langer Medianschnitt an der ventralen Schwanzseite zwischen dem vierten und dem fünften Schwanzwirbel. Anschließend wurde die *Vena coccygea* auf einer Länge von etwa 3 cm freipräpariert. Zwei Schlingen aus Catgut dienten als Zügel zur besseren Fixierung bei Manipulationen am Gefäß. Nach erfolgter Inzision wurde der bei 50, 60 und 65 cm Länge markierte Katheter eingeführt und langsam bis zur gewünschten Länge im Gefäß nach kranial geschoben.

Nunmehr wurden zwei, etwa 5 mm lange, straff auf dem Katheter sitzende, jedoch das Lumen nicht einengende Schlauchstücke aus Kunststoff über den Katheter gezogen und bis an die Eintrittsstelle des Katheters in das Gefäß gebracht. Zwischen diesen Schlauchstücken wurde ein Catgutfaden platziert, welcher zur Fixierung des Katheters am umliegenden Gewebe diente. Das freie Katheterende wurde durch einen subkutanen Stichkanal paramedian zwischen Schwanzwurzel und Kruppe gebracht und durch einen Hautschnitt nach außen geführt. Der Katheteransatz wurde mittels einer stumpfen Kanüle mit Kappe verschlossen und in einer an der Austrittsstelle aufgenähten Tasche verwahrt. Der Verschluss der Schwanzwunde erfolgte subkutan durch eine fortlaufende Naht mit resorbierbarem Material, und die Haut wurde mit einer rückläufigen Einzelknopfnahnt adaptiert.

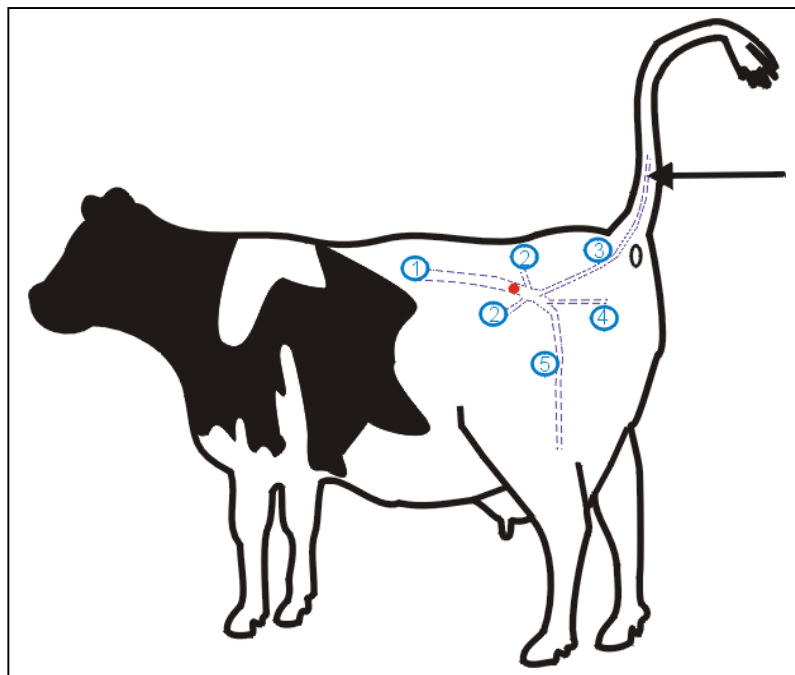


Abbildung 7.

Schematische Darstellung der anatomischen Situation bei der Katheterisierung der Vena cava caudalis (modifiziert nach SCHALLENBERGER, 1990). Der Pfeil markiert die Stelle des Eintrittes des Katheters in die Vena coccygea. Die Katheterspitze liegt im Bereich des roten Punktes.

- ① Vena cava caudalis
- ② Vena ovarica
- ③ Vena coccygea
- ④ Vena iliaca interna
- ⑤ Vena iliaca externa

Zur Pflege der Katheter wurden diese nach jeder Blutentnahme, mindestens jedoch zweimal täglich (8.00 und 14.00 Uhr) mit einer Heparin-Kochsalzlösung (50 IE Heparin pro 1 ml 0,9 % NaCl) gefüllt. Bei Entnahme über den Katheter wurden die zuerst entnommenen 2-3 ml Blut verworfen. Das sofort im Anschluss daran gewonnene Blut wurde mit 0,1 ml Ethylendiamintetraazetat (EDTA) versetzt, 3-4mal geschwenkt und nachfolgend unverzüglich bei 3500 min^{-1} für 15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde in 2- bzw. 5-ml-Probengefäße verbracht und bei -20°C bis zum Zeitpunkt der Hormonbestimmungen aufbewahrt.

3.1.3 Ultraschalluntersuchungen der Ovarien

Die Ultraschalluntersuchungen der Ovarien erfolgten transrektal mit einem B-mode-Scanner (CS 91000, Hitachi) mit 5,0-MHz-Linearschallkopf. Sie wurden über den gesamten Versuchszeitraum von einer Person durchgeführt und folgten immer demselben Schema.

Vor und während jeder Manipulation wurden die adspektorisch wahrnehmbaren Brunstsymptome des Tieres erfasst. Die Uteruskontraktilität wurde während der Rektumentleerung beurteilt. Im Anschluss daran wurde zunächst das linke, danach das rechte

Ovar ultrasonographisch untersucht. Dabei wurde der Schallkopf immer in derselben Art und Weise und unter Vermeidung unnötiger manueller Irritation von einem zum anderen Pol geführt. Diese Prozedur wurde gegebenenfalls ein- bis zweimal wiederholt. Während der Untersuchung erfolgte die Beurteilung der wahrnehmbaren Strukturen durch zwei Personen. Die Durchmesser der jeweils größten Follikel wurden mit Hilfe eines installierten Bildverarbeitungssystems ermittelt. Es erfolgte die Erfassung von Anzahl und Größe der kleineren Follikel. Die genaue Dokumentation der Lagebeziehungen markanter ovarieller Gebilde zueinander wurde während bzw. unmittelbar im Anschluss an die Untersuchung vorgenommen. Alle Ultraschalluntersuchungen wurden auf Videoband mit S-VHS-Qualität aufgezeichnet. In der Abbildung 8 ist ein Ultraschallbild dargestellt.

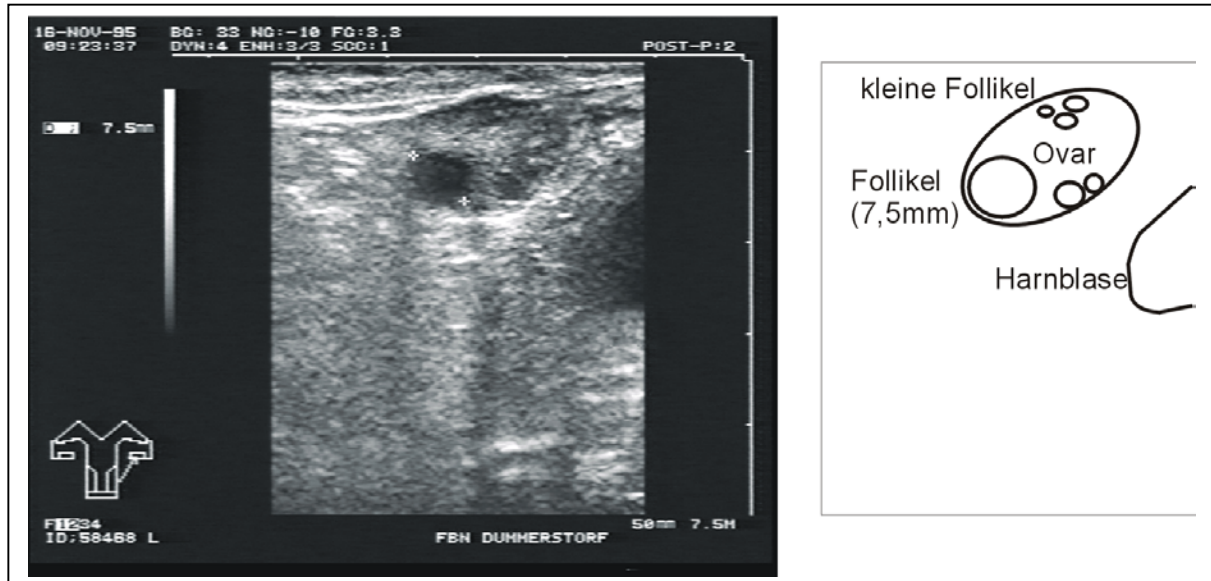


Abbildung 8. Ultraschallbild (links) eines Ovars mit Follikeln verschiedener Größe. Der größte sichtbare Follikel wurde in diesem Fall ausgemessen, sein Durchmesser betrug 7,5 mm. Bei der Beurteilung der Ultraschall-Standbilder ist zu beachten, dass die Follikelwand-Konturen undeutlich werden können. Eine genaue Abgrenzung, insbesondere der kleinen Follikel, ist oft nur mit Hilfe bewegter Bilder möglich. Rechts sind die Lagebeziehungen schematisch dargestellt.

Mit dem Ziel der Minimierung subjektiver Einflüsse wurde die qualitative und quantitative Auswertung der Videoaufnahmen tierweise, sowie erst nach Beendigung des jeweiligen Versuches vorgenommen. Die gewonnenen Daten wurden entsprechend der von GINTHER (1995) beschriebenen Methoden (identity method und nonidentity method) ausgewertet. Die „identity method“ ist jene Methode, bei der individuelle Follikel von Untersuchung zu Untersuchung verfolgt werden, während bei der „nonidentity method“ Wachstumskurven von Follikeldurchmessern erstellt werden, ohne deren Identität zu berücksichtigen. Bei jedem Tier kamen beide Methoden in Kombination zum Einsatz. Diese Vorgehensweise gestattet einerseits die Identifizierung und Beobachtung individueller Follikel, wie es bei dem jeweils größten (dominanten) Follikel und teilweise bei subordinaten Follikeln erfolgte.

Andererseits konnten das Wachstumsverhalten und die Anzahl der anderen, nicht immer individuell zu charakterisierenden Follikel ebenfalls untersucht werden. Als Beginn einer Follikelreifungswelle wurde der Tag des Erscheinens einer Kohorte von vier bis sechs

wachsenden Follikeln mit einem Durchmesser von 4 mm angesehen (GINTHER, 1995). Beim Rind wurde die ultrasonographische Untersuchung von Follikeln ab einer Größe von 2 mm beschrieben und die Verlässlichkeit der Ergebnisse belegt (AMBROSE und Mitarb., 1998). Anzahl und Größe der im histologischen Schnitt gefundenen Follikel korrelieren eng mit den durch Ultraschalluntersuchung nachgewiesenen Follikelparametern (PIERSON und GINTHER, 1987b; GONG und Mitarb., 1993). Zur Auswertung der Follikelentwicklung erfolgte die Zuordnung zu folgenden Follikelgrößenklassen:

- kleine Follikel (1 bis 3,9 mm)
- mittelgroße Follikel (4 bis 8 mm)
- große Follikel (> 8 mm).

Zur **Beschreibung der Follikeldynamik** wurden folgende statistisch zu bearbeitende Parameter herangezogen:

- Anzahl beteiligter Follikel an einer Reifungswelle
- Maximaler Durchmesser des dominanten Follikels (DF_{\max})
- Zeitpunkt der erstmaligen Feststellung des DF_{\max}

- Gesamtanzahl der an bestimmten Zeitpunkten erfassten Follikel
- Anzahl kleiner Follikel (1 bis 3,9 mm)
- Anzahl mittelgroßer Follikel (4 bis 8 mm)
- Anzahl der großen Follikel (> 8 mm).

3.1.4 Decapeptyl® Depot

Das Decapeptyl® Depot (Ferring, Kiel, Deutschland) ist eine mikroverkapselte Formulierung des GnRH-Agonisten D-Trp⁶-GnRH (Triptorelin). Die Trägersubstanz besteht zu gleichen Teilen aus Polyglykolsäure und Polymilchsäure. Die Applikation erfolgte als einmalige intramuskuläre Injektion von 7,5 mg Decapeptyl® Depot. Verglichen mit dem nativen GnRH hat Triptorelin nach Angaben des Herstellers eine längere Halbwertszeit und eine höhere Affinität zu den hypophysären GnRH-Rezeptoren. Bei Frauen sichert bereits eine Dosis von 3,75 mg Decapeptyl® Depot eine kontinuierliche Triptorelin-Freisetzung über 28 Tage. Eigene Voruntersuchungen im FBN Dummerstorf haben gezeigt, dass die Applikation von 7,5 mg Decapeptyl® Depot bei Jungrindern zum Ausbleiben der Ovulationen und damit zum Erliegen des Zyklus über 40 Tage führt. Die Applikation des GnRH-Agonisten Decapeptyl® Depot erfolgte bei den Versuchstieren (V) 60 Stunden nach der Prostaglandin-Applikation, am Versuchstag 0 (Tag 0). Die Tiere der Kontrollgruppe (K) erhielten zeitgleich das vom Hersteller empfohlene Lösungsmittel (10 % Dextran 70, 1 % Tween 80, 0,01M NaH₂PO₄, 0,78% NaCl, mit NaOH auf pH 6,8-7 eingestellt).

Das Zeitintervall von 60 Stunden wurde gewählt, da der präovulatorische LH-Gipfel normalerweise 60 Stunden nach Applikation des Prostaglandins erfolgt (KARG und Mitarb., 1976; KANITZ und Mitarb., 1996). Alle nachfolgenden Maßnahmen sind in Kapitel 3.1.5 beschrieben.

3.1.5 Klinische Experimente

Ziel der Untersuchungen war es, den Einfluss des GnRH-Agonisten in Depotformulierung auf die Follikeldynamik und die Hormonkonzentration während der Dauer eines Zyklus zu untersuchen und Ursachen für festgestellte Veränderungen aufzuzeigen.

Unter dieser Zielstellung wurden folgende tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt:

3.1.5.1 Untersuchungen zum endogenen bzw. induzierten LH-Gipfel und zum Ovulationsverhalten

Zur Aufklärung des Einflusses von Decapeptyl® Depot auf die LH-Konzentration und das Ovulationsverhalten unmittelbar nach Applikation des Wirkstoffes im Zeitraum des erwarteten endogenen LH-Gipfels wurden insgesamt 38 Tiere untersucht. Davon erhielten 21 Tiere am Tag 0 Decapeptyl® Depot (V), 17 Tiere erhielten Lösungsmittel und dienten als Kontrolltiere (K). Im Anschluss an die Applikation des GnRH-Agonisten wurde zur Ermittlung der Gonadotropinkonzentration eine frequente Blutentnahme über 6 Stunden mit 15-minütigen Abständen durchgeführt. Vom Tag 0 bis zur Ovulation erfolgte täglich zwischen 7.00 und 8.00 Uhr die Ultraschalluntersuchung der Ovarien, um Aussagen über das Ovulationsverhalten treffen zu können.

3.1.5.2 Untersuchungen zur Follikeldynamik

Um Aussagen zur Follikeldynamik über den Zeitraum eines Zyklus nach Applikation des Decapeptyl® Depot treffen zu können, erfolgte bei 10 Tieren (4K; 6V) eine intensive Ultraschalluntersuchung der Ovarien nach den im Kapitel 3.1.3 dargestellten Kriterien. Diese Untersuchung wurde im periovulatorischen Zeitraum täglich, im Anschluss daran, bis zum Tag 21, jeden zweiten Tag vorgenommen.

Aussagen über Follikelanzahl und -beschaffenheit am Ende der Versuchsperiode (nach Ablauf einer Zykluslänge) wurden anhand der Untersuchungen an insgesamt 17 Tieren (7K; 10V) getroffen. Dazu erfolgte am Tag 21 nach Applikation des Decapeptyl® Depot die Schlachtung bzw. Kastration der Tiere, mit dem Ziel, die Ovarien einer makroskopischen Beurteilung unterziehen zu können. Die Einteilung der Follikel erfolgte dabei in die im Kapitel 3.1.3 beschriebenen Größenklassen.

3.1.5.3 Untersuchungen zur pulsatilen Gonadotropinsekretion

Für die Charakterisierung der LH-Sekretion wurden an den Versuchstagen 1 bis 5, 11 und 15 jeweils in der Zeit von 8.00 bis 14.00 im Abstand von 15 Minuten frequente Blutentnahmen durchgeführt. Die Anzahl der an den einzelnen Tagen untersuchten Kontroll- und Versuchstiere ist in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13. Anzahl der Kontroll- und Versuchstiere, die für die Untersuchung der pulsatischen LH- und FSH-Sekretion an den einzelnen Tagen zur Verfügung standen.

| Tag | Anzahl (n) | |
|-----|---------------|---------------|
| | Kontrolltiere | Versuchstiere |
| 0* | 7 | 14 |
| 1 | 13 | 14 |
| 2 | 11 | 12 |
| 3 | 9 | 10 |
| 4 | 6 | 8 |
| 5 | 7 | 10 |
| 11 | 7 | 10 |
| 15 | 7 | 10 |

*Die Angaben für den Tag 0 beziehen sich nur auf die Bestimmung der pulsatischen FSH-Sekretion

Bei denselben Tieren wurde auch die pulsatile FSH-Sekretion untersucht. Hinsichtlich des Untersuchungszeitpunktes wurde neben den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 auch der Tag 0 berücksichtigt.

3.1.5.4 Untersuchungen zum Verlauf der Steroidhormonkonzentration

Für die Untersuchungen der Konzentration der Steroidhormone P_4 und E_2 im Verlauf des Zyklus nach Applikation des Decapeptyl® Depot erfolgte die Blutentnahme an den Tagen 0 bis 21 zweimal täglich (8.00 und 14.00 Uhr). Zur Auswertung der Konzentration von P_4 und E_2 über 21 Tage standen 17 Tiere (10V; 7K) zur Verfügung. Hinsichtlich der Auswertung der E_2 -Konzentration wurden zusätzlich an den Tagen -2 und -1 Blutproben entnommen, um Aussagen über die Konzentration vor dem LH-Gipfel treffen zu können. Die Zahl der zur Analyse der Konzentration von verwendeten Kontroll- und Versuchstieren ist in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14. Anzahl der Tiere, bei denen zweimal täglich Blut entnommen wurde, um Aussagen über die Konzentration von E_2 treffen zu können

| Zeitraum /Versuchstag | Anzahl (n) | |
|-----------------------|---------------|---------------|
| | Kontrolltiere | Versuchstiere |
| -2 bis -1 | 13 | 15 |
| 0 bis 4 | 15 | 19 |
| 5 bis 21 | 7 | 10 |

[illegible]

| Tag | -3 | -2 | -1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|--|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Maßnahmen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Injektion PGF _{2α} (20.00 Uhr) | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Verlegen der Katheter | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Injektion Decapeptyl® Depot/ Mannitol (08.00 Uhr) | | | | X | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ultraschalluntersuchung der Ovarien | X | | | X | X | X | X | X | X | | X | | X | X | X | | X | | X | | X | | X | | X | | |
| Blutentnahme zur Bestimmung von FSH und LH (von 8.00 bis 14.00 Uhr alle 15 min) | | | | X | X | X | X | X | X | | | | | | X | | | | X | | | | | | | | |
| Blutentnahme zur Analyse der Steroidhormonkonzentrationen 2x täglich, 8.00 und 14.00 Uhr) | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | |
| Kastration | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | X | | | | |
| Schlachtung Gewinnung der Ovarien und Hypophysen) | | | | | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | | |

3.1.6 Quantitative Hormonanalysen

3.1.6.1 FSH

Die Analyse der FSH-Konzentrationen wurde jeweils in Doppelbestimmungen mit einem neuentwickelten, isotopefreien Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) vorgenommen, dessen Grundlagen erstmals von DEEVER (1995) beschrieben wurden. Dabei konkurriert nichtmarkiertes FSH mit einer konstanten Menge von ruthenium-markiertem FSH um eine begrenzte Anzahl von spezifischen Bindungsplätzen an einem bovinen FSH-Antikörper. Als Reinsthormon für die Erstellung der Standardkurve (0,095 bis 50 ng/ml) und für die Markierung mit einer speziellen Rutheniumverbindung wurde eine international anerkannte Standardpräparation aus ovinen Hypophysen (o-FSH; AFP 7571 A, USA) verwendet. Die Markierung und die säulenchromatographische Fraktionierung des Produktes erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers (IGEN, Gaithersburg, USA). Als Quelle für den Antikörper diente ein in Kaninchen erzeugtes Antiserum gegen ovines FSH (NIDDK-oFSH, USA). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Trennung von gebundenem und freiem Hormon (B/F-Trennung) erfolgte mit dem an magnetische Partikel (Beads) gekoppelten zweiten Antikörper, einem Schaf-anti-Kaninchen-IgG (Dynal, Hamburg, Deutschland). Die Empfindlichkeit der Methode liegt bei 0,12 ng/ml, die Kreuzreaktivität beträgt 0,07 % gegenüber bovinem TSH (AFP-3681A), und 0,03 % gegenüber bovinem LH (AFP-3681A). Aufgrund der gegenüber herkömmlichen ^{125}I -RIA-Methoden gesteigerten Empfindlichkeit sind 0,05 ml Plasma zur Erfassung des FSH-Gehaltes ausreichend. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient lag bei 7,4 %, während der Inter-Assay-Variationskoeffizient 9,4 % betrug. Alle Proben eines Tieres wurden jeweils innerhalb desselben Assay untersucht.

3.1.6.2 LH

Die LH-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines homologen, kompetitiven ^{125}I -Radioimmunoassay (RIA) in Doppelbestimmung gemessen. Als Reagenz für die Jodierung mittels modifizierter Chloramin-T-Methode und für das Erstellen der Standardkurve diente die Präparation IWF 5026 (Biotez, Berlin, Deutschland). Die Standardkurve lag im Bereich von 0,5 bis 64 ng/ml. Der Primärantikörper (B 20; Titer 1: 100 000) stammt aus Kaninchen.

Der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG; Titer 1:12) wurde von der Firma Sifin (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Sensitivität des Assays ($B_0 - 3s$) lag bei 0,2 ng/ml. Die Potenz des Standards NIH-LH-B9 betrug 66,6 % im Vergleich zum reinen bovinen LH (KANITZ und Mitarb., 1990). Die Kreuzreaktivität mit anderen Hormonen war gering: NIH-FSH-S11 = 0,4 %; USDA-bGH-B11 < 0,1 %; USDA-bPRL-b-1 < 0,1 %. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient lag zwischen 9 und 15 % und der Inter-Assay-Variationskoeffizient betrug 11 bis 15 %. Die Hormonkonzentrationen für jedes Tier wurden in einem Assay gemessen. Je untersuchte Blutprobe kamen 0,1 ml Plasma zum Einsatz.

3.1.6.3 Estradiol

Die Bestimmung der E₂-Konzentrationen erfolgte in Doppelbestimmung nach der Extraktion mit Diethylether mit Hilfe eines ³H-RIA (BLÖDOW und Mitarb., 1988). Es kam ein gereinigter Antikörper gegen Estradiol-6-CMO-BSA-Konjugat zum Einsatz, der von Kaninchen stammt. Zur B/F-Trennung wurde eine Dextran-Aktivkohle-Suspension eingesetzt. Die Empfindlichkeit des Assays lag bei 2 pg/ml. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient lag bei 8,5 % und der Inter-Assay-Variationskoeffizient betrug 12 %. Je Probe wurde 1 ml Plasma zur Bestimmung verwendet.

3.1.6.4 Progesteron

Die P₄-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines direkten, kompetitiven ³H-RIA gemessen (BLÖDOW und Mitarb., 1988). Der Tracer (1,2,6,7-³H-Progesteron) wurde von Amersham (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Der Antikörper wurde in Kaninchen durch Immunisierung mit einem 11-Hydroxy-Progesteron-Konjugat erzeugt. In Modifikation der Originalmethode wurde das Antiserum mittels Bindungschromatografie auf Protein A Superose gereinigt. Die Messung erfolgte in einem Flüssigszintillationsspektrometer mit integrierter RIA-Auswertung (Wallac, Finnland). Der Intra-Assay-Variationskoeffizient lag bei 8,5 % und der Inter-Assay-Variationskoeffizient betrug 10 %. Es wurden Doppelbestimmungen mit 0,05 ml Plasma je Probe durchgeführt.

3.1.7 Statistische Auswertungsverfahren

Die Parameter zur Kennzeichnung der ersten und zweiten **Follikelreifungswelle** (siehe Kapitel 3.1.3) wurden mittels t-Test miteinander verglichen.

Die Auswertung der **Follikelzahlen** in den einzelnen Kategorien erfolgte mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse mit dem Faktor „Behandlung mit Decapeptyl[®] Depot“. Die Auswertung erfolgte getrennt nach Tagen. Der Vergleich der Werte an den einzelnen Tagen wurde mit Hilfe eines t-Tests vorgenommen.

Die Beschreibung der Gonadotropinsekretion erfolgt mit Hilfe der aus dem Pulsdetektionsprogramm PULSAR, Version 2.0 (MERRIAM und WACHTER, 1982) ermittelten Parameter:

- Pulsanzahl
- Pulsamplitude
- Pulsfläche
- Basalniveau.

Das für die Auswertung der Konzentration der Gonadotropine **FSH und LH** zugrunde gelegte statistische Modell ist ebenfalls die einfache Varianzanalyse mit dem Faktor „Behandlung mit Decapeptyl[®] Depot“, wobei die Auswertung getrennt nach Tagen mit Hilfe der Prozedur

GLM des Statistikpaketes SAS[®] vorgenommen wurde. Da die Messwerte an aufeinanderfolgenden Tagen als abhängig zu betrachten sind, wurde zum Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Tage untereinander ein gepaarter t-Test durchgeführt.

Zur Auswertung der **Progesteronkonzentration** an den einzelnen Versuchstagen wurde der Mittelwert aus den beiden am jeweiligen Tag entnommenen Blutproben herangezogen. Als Maß für den Anstieg der Progesteronkonzentration wurde die Differenz der Progesteronwerte zwischen den Tagen 11 und 2 bei den Kontroll- und Versuchstieren gebildet. Zum Vergleich beider Gruppen wurde ein t-Test durchgeführt.

Die Untersuchung der Verringerung der Progesteronkonzentration an den Tagen 16 bis 20 wurde mit Hilfe des gepaarten t-Tests (getrennt nach Behandlung) durchgeführt.

Die Prüfung der Einflüsse von Tag, Behandlung mit Decapeptyl[®] Depot und Tag x Behandlung mit Decapeptyl[®] Depot erfolgte anhand der Analyse der wiederholten (repeated) Messungen in einem Modell mit dem Hauptfaktor „Behandlung mit Decapeptyl[®] Depot“ und einem repeated Faktor „Tag nach Applikation“. Bei dieser Analyse gehen nur Tiere mit einem vollständigen Datensatz in die Auswertung ein.

Die **Estradiolkonzentration** wurde anhand der gewonnenen Einzelwerte beurteilt, so dass täglich zwei Messwerte für die Auswertung zur Verfügung standen. Die Erhöhung der Konzentration von Estradiol-17 β im Zeitraum vor dem LH-Gipfel wurde definiert als die Differenz aus dem gemessenen Maximalwert der Erhöhung und dem vorangegangenen niedrigsten Wert. Analog dazu ist der Abfall der Konzentration von Estradiol-17 β im Zeitraum nach dem LH-Gipfel die Differenz aus dem gemessenen niedrigsten Wert und dem vorangegangenen höchsten Wert. Der Vergleich dieser Differenzen erfolgte mittels t-Test.

3.1.7.1 Auswertung der pulsatilen und basalen Gonadotropinkonzentrationen

3.1.7.1.1 Begriffsklärung

In der vorliegenden Studie wurden in Anlehnung an die Arbeiten von SCHALLENBERGER (1990) und GINTHER und Mitarb. (1998) folgende Annahmen zugrundegelegt:

Ein **Puls** ist ein kurzzeitiger, diskreter Hormonkonzentrationsanstieg auf ein vielfaches des Basalniveaus mit einer Dauer bis 2 Stunden. Pulse repräsentieren Kurzzeittrends. Konkrete Pulse wurden in dieser Arbeit ausschließlich mit dem Pulsdetektionsprogramm PULSAR, Version 2.0 (MERRIAM und WACHTER, 1982) ermittelt.

Die **Pulsamplitude** ist die Differenz zwischen dem höchsten Wert und dem vorhergehenden Basalwert der Hormonkonzentration. In dieser Studie wurden die vom PULSAR-Programm, Version 2.0 (MERRIAM und WACHTER, 1982) ermittelten Werte verwendet.

Die **Basalkonzentration** ist die Hormonkonzentration, die den Pulsen zugrunde liegt. Von dieser Konzentration gehen die Pulse aus. In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls die

vom PULSAR-Programm, Version 2.0 (MERRIAM und WACHTER, 1982) ermittelten Werte verwendet.

Ein **Gipfel (Peak)** der LH- bzw. FSH-Konzentration ist ein einmaliger abrupter Anstieg der Hormonkonzentration für eine längere Zeit (für die Dauer mehrerer Pulse) sowie auf bedeutend höhere Werte (z.B. präovulatorischer LH-Gipfel).

3.1.7.1.2 Pulsdetektionsprogramm PULSAR, 2.0

Um eine Aussage über den Einfluss des Decapeptyl® Depots auf das Sekretionsverhalten der Gonadotropine treffen zu können, erfolgte die Analyse der Ergebnisse aus den Intervallen frequenter Blutentnahme mit dem FORTRAN-Programm PULSAR Version 2.0 (MERRIAM und WACHTER, 1982), in der von Sten Rosenberg modifizierte Version zur Anwendung am PC. Dieses Programm identifiziert einzelne Pulse nach Amplitude und Dauer der Hormonkonzentrationsänderung mit Hilfe der glättenden Technik (Variante des 'moving average') und unter Einbeziehung der Standardabweichung jedes einzelnen Assays. Auf diesem Wege wurden Pulsanzahl, Pulsamplitude, Pulsfläche sowie das basale Niveau der Gonadotropinsekretion ermittelt. Die verwendeten 'G' Parameter zur Charakterisierung der einzelnen Pulse betrugen 1,9; 1,3; 0,95; 0,75 und 0,6 für G (1) bis G (5). Als Fenstergröße zur Ermittlung der Basalkonzentration wurde 0,5 festgelegt. Für die Bestimmung des Basalniveaus wird die 'glättende' Technik verwendet. Die daraus resultierende Basallinie repräsentiert Langzeittrends. Werden die Basalwerte von den Originalwerten subtrahiert, entstehen Residuen, welche die Kurzeiteinflüsse, wie sie beispielsweise bei pulsatiler Ausschüttung vorhanden sind, berücksichtigen.

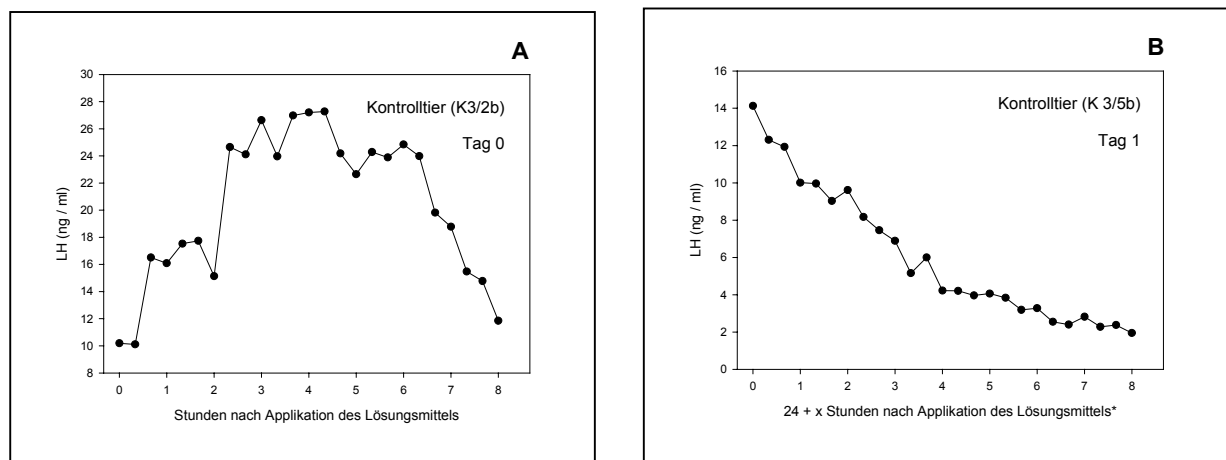
4 Ergebnisse

4.1 Präovulatorische LH-Konzentrationen, Ovulationen und Follikeldynamik bei Kontroll- und Versuchstieren

Insgesamt können bezüglich der präovulatorischen LH-Konzentrationen und der nachfolgenden Ovulationen zu Beginn des Zyklus die Daten von 34 Tieren (15K; 19V) zur Auswertung verwendet werden. Vier Tiere (2K, 2V) mussten von der Auswertung ausgeschlossen werden. Zwei Tiere hatten eine Doppelovulation und bei den anderen beiden Tieren ist im Verlauf der Untersuchungen der Katheter funktionsuntüchtig geworden.

4.1.1 Präovulatorische LH-Konzentrationen

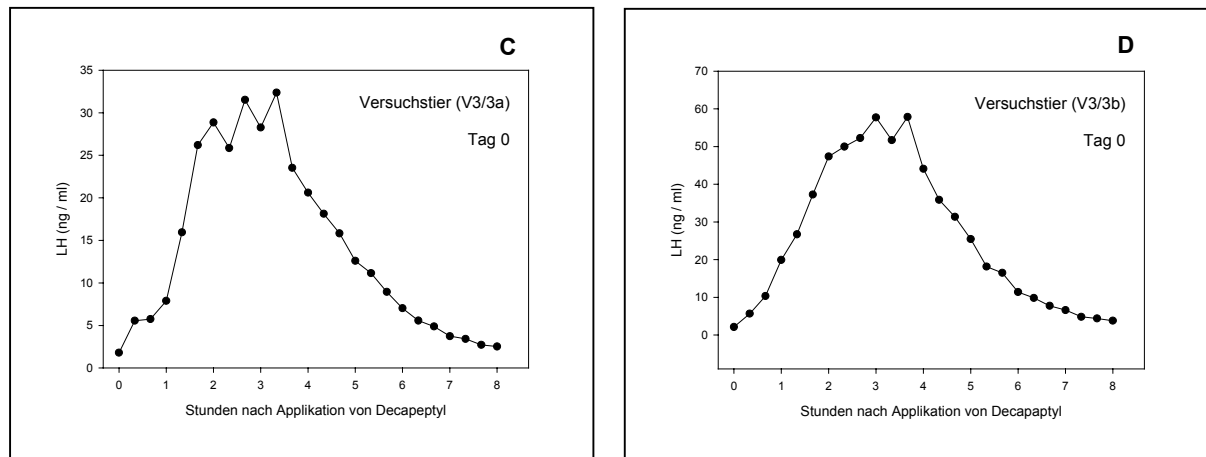
Bei 67 % (10/15) der Kontrolltiere wurde der aufsteigende und/oder der abfallende Schenkel des endogenen LH-Gipfels im Blutentnahmeintervall nachgewiesen (Abbildungen 9 A und B). Der spontane LH-Gipfel war bei 40 % (6/15) der Kontrolltiere am Tag 0 und bei 27 % (4/15) der Kontrollen am Tag 1 feststellbar. Bei den verbleibenden 33 % (5/15) der Kontrollgruppe erfolgte der LH-Gipfel vermutlich außerhalb der Zeiten der frequenten Blutentnahme.



Abbildungen 9 A und B. Individuelle Verläufe der präovulatorischen LH-Konzentrationen. **A:** Ein teilweise erfasster endogener LH-Gipfel bei einem Kontrolltier (inklusive LH-Maximum) am Tag 0. **B:** Ein teilweise erfasster endogener LH-Gipfel (absteigender Schenkel des LH-Gipfels) bei einem Kontrolltier am Tag 1. *Die Bezeichnung der x-Achse differiert von den übrigen Darstellungen, weil es sich in diesem Fall um den Versuchstag 1, d.h. 24 + x Stunden nach Applikation des Lösungsmittels (Tag 1 nach Applikation) handelt.

Im Anschluss an die GnRH-Applikation hatten alle Versuchstiere (100 %, 19/19) einen LH-Gipfel mit maximalen Konzentrationen zwischen 15 und 78 ng/ml, welche im Zeitraum von zwei bis vier Stunden nach der Applikation erreicht wurden.

Sechs Stunden nach der Applikation lagen die LH-Konzentrationen bei 73,7 % (14/19) der Versuchstiere zwischen 0,7 und 4 ng/ml. Bei den verbleibenden 26,2 % (5/19) wurden Werte zwischen 5 und 10 ng/ml gemessen. Die Rückkehr der LH-Konzentrationen auf Werte zwischen 1 und 2 ng/ml war bei allen Versuchstieren am Morgen des Tages 1 post applicationem abgeschlossen. Die Abbildungen 9 C und D zeigen individuelle Verläufe der präovulatorischen LH-Konzentrationen bei zwei Versuchstieren.



Abbildungen 9 C und D. Zwei induzierte LH-Gipfel bei Versuchstieren (am Tag 0) mit Maximalkonzentrationen, die zwischen zwei bis vier Stunden nach der Applikation des Decapeptyl® Depot erreicht wurden.

4.1.2 Ovulationen zu Beginn der Versuchsperiode

In der Kontrollgruppe ovulierten 100 % (15/15) der Tiere. Dabei ereigneten sich die Ovulationen bei 40 % (6/15) der Tiere zwischen (den Ultraschalluntersuchungen an) den Tagen 0 und 1. Ebenfalls 40 % (6/15) der Kontrolltiere ovulierten zwischen den Tagen 1 und 2. Die verbleibenden 20 % (3/15) ovulierten zwischen den Tagen 2 und 3. Im Anschluss an die Ovulationen erfolgte bei allen Kontrolltieren die reguläre Ausbildung eines Corpus luteum.

Bei 95 % (18/19) der Versuchstiere erfolgte nach Applikation des GnRH-Agonisten die Ovulation, und nachfolgend konnte ultrasonographisch die reguläre Entwicklung eines Corpus luteum beobachtet werden (siehe Abbildung 10). Ein Versuchstier (5 %, 1/19) hatte keine Ovulation. Jeweils 47,5 % (9/19) der Versuchstiere ovulierten zwischen Tag 0 und 1 bzw. zwischen den Tagen 1 und 2 nach der Applikation des Decapeptyl® Depot.

Die Abbildung 10 zeigt ultrasonographische Aufnahmen eines präovulatorischen Follikels bei einem Versuchstier am Tag 0 und das Corpus luteum 12 Tage nach der Ovulation.

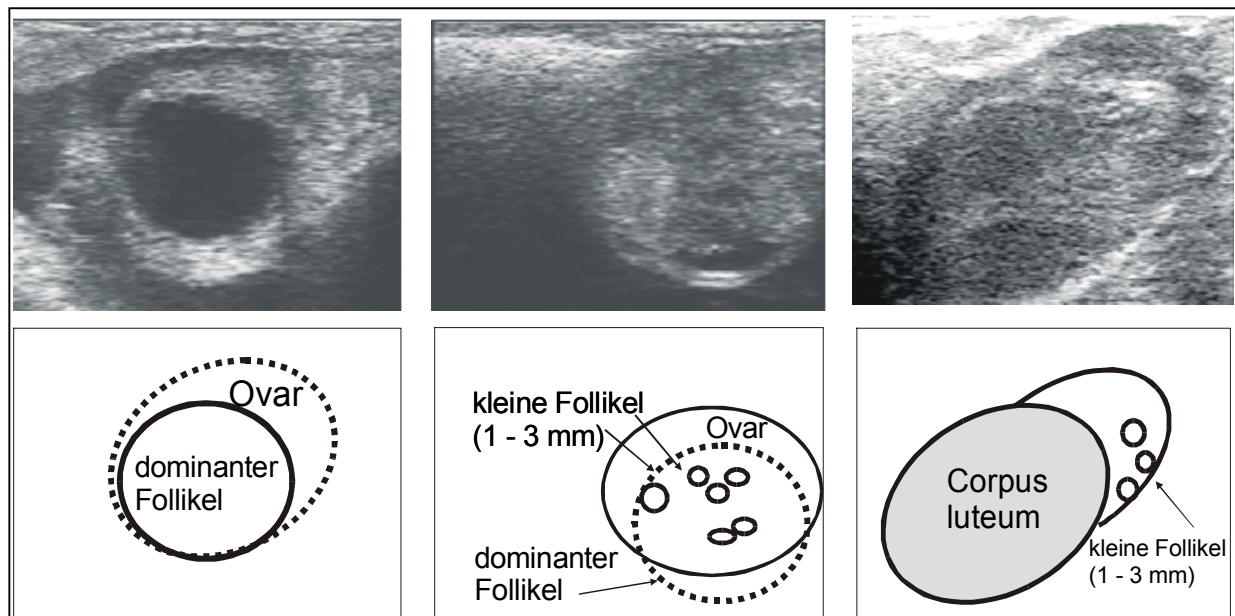


Abbildung 10. Ultraschallbilder vom Ovar eines Versuchstieres (2/3) vor der Ovulation und in Zyklusmitte. Die Bilder entsprechen einer Größe von 30 x 40 mm. In der zweiten Reihe sind die Lageverhältnisse schematisch dargestellt. *Links:* Der präovulatorische Follikel am Tag 0, *Mitte:* Derselbe Follikel im Hintergrund, davor sind mehrere kleine Follikel zu erkennen. *Rechts:* Gelbkörper, der sich an der Ovulationsstelle dieses Follikels entwickelt hat (Tag 13), rechts oben im Bild sind noch einige kleine Follikel zu erkennen. In der schematischen Abbildung ist der Gelbkörper grau dargestellt.

4.1.3 Follikeldynamik

Insgesamt konnten bezüglich der Follikeldynamik die Daten von acht Tieren (5 V; 3 K) ausgewertet werden. Ein Versuchstier musste von der Analyse ausgeschlossen werden, da bei diesem Tier eine kontinuierliche Ultraschalldiagnostik über den gesamten Versuchszeitraum

nicht möglich war.

Ein Kontrolltier fand aufgrund einer Doppelovulation in der Auswertung keine Berücksichtigung, weil der Zeitpunkt der zweiten Ovulation nicht exakt zu beurteilen war.

Aussagen über die Follikelanzahl und -beschaffenheit am Ende der Versuchsperiode (nach Ablauf einer Zykluslänge) werden anhand der Daten der dazu untersuchten Tiere (7K; 10V) getroffen.

4.1.3.1 Follikeldynamik der Kontrolltiere

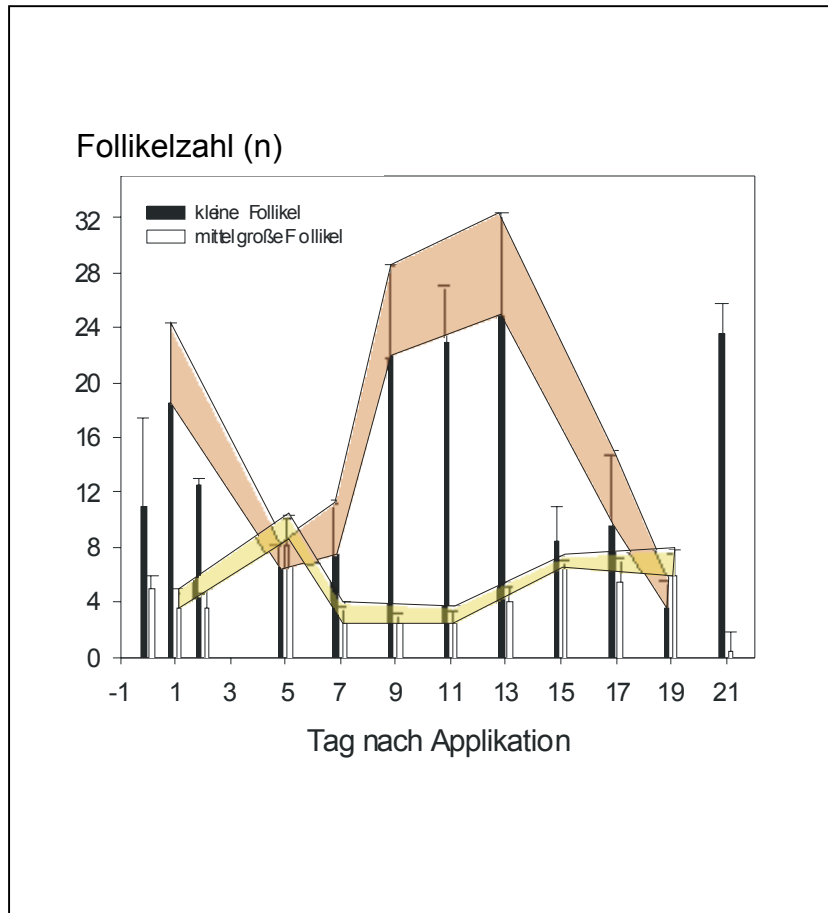
Bei zwei Kontrolltieren waren im beobachteten Zyklus jeweils zwei Follikelreifungswellen ausgebildet. Ein Tier hatte drei Follikelreifungswellen, deren Ablauf am Ende dieses Kapitels gesondert beschrieben wird. Das Tier mit dem dreiwelligen Follikelwachstumsverlauf wurde nicht in die vergleichende Betrachtung der Follikelentwicklung bei Kontroll- und Versuchstieren einbezogen, weil unter dem Einfluss des GnRH-Agonisten jeweils nur zwei Wellen follikulärer Aktivität beobachtet wurden.

In der folgenden Beschreibung wurden die Tiere mit zweiwelligem Follikelwachstum gemeinsam ausgewertet. Aufgrund des Stichprobenumfanges kann lediglich ein erster Ansatz für vergleichende Aussagen zur Follikelentwicklung bei Kontroll- und Versuchstieren geliefert werden. Das gewählte statistische Modell der Varianzanalyse ist jedoch aufgrund der Annahme der gleichen Restvarianz in den Behandlungsstufen zum Vergleich der beiden Gruppen geeignet.

Am Tag vor der Ovulation und in der Zyklusmitte (Tag 11 bei Tier 1/5; Tag 13 bei Tier 1/6, also jeweils im Untersuchungszeitraum nach der Feststellung des Maximaldurchmessers des ersten dominanten Follikels) sind in den individuellen Verläufen Maxima der Gesamtfollikelanzahl und der Follikel < 4 mm aufgetreten. Ultrasonographisch war an den genannten Tagen der Beginn der Follikelreifungswellen zu beobachten.

Desweiteren erfolgte eine erneute Erhöhung der Anzahl der Follikel der beiden genannten Kategorien am Tag 21.

Es bestand bei diesen Tieren mit einem zweiwelligem Follikelwachstumsverlauf eine inverse Beziehung (Abbildung 11) zwischen der Anzahl kleiner und der mittelgroßer Follikel: Während der Tage 1 bis 5 sank die Anzahl kleiner Follikel bei den Kontrolltieren, gleichzeitig erhöhte sich in die Zahl mittlerer Follikel. Ab Tag 5 sank die Zahl der mittelgroßen Follikel wieder deutlich und blieb bis zum Tag 11 auf niedrigem Niveau. Vom Tag 13 an erfolgte ein erneuter Anstieg der Zahl mittelgroßer Follikel bei einem gleichzeitigen Abfall der Zahl kleiner Follikel bis zum Tag 19.

**Abbildung 11.**

Anzahl der Follikel kleiner und mittlerer Größe bei den Kontrolltieren mit zweiwelligem Follikelwachstumsverlauf während des Zyklus. Mit Hilfe der beiden Bänder soll der inverse Verlauf der Anzahl der Follikel beider Größenklassen dargestellt werden. Die Breite der Bänder entspricht dem Standardfehler der Follikelanzahl an den Tagen 1, 5, 7, 9, 13 und 19 bei den kleinen Follikeln (hellrotes Band) und an den Tagen 1, 5, 7, 11, 15 und 19 bei den mittelgroßen Follikeln (gelbes Band).

Auch die Follikel mit Durchmessern von 4 bis 8 mm unterlagen einem wellenförmigen Wachstumsverlauf. Die größte Anzahl dieser Follikel mittlerer Größe lag an den Tagen 5 und 15 vor. Follikel mit Durchmessern über 8 mm konnten bei den Kontrolltieren zu jedem Untersuchungszeitpunkt nachgewiesen werden. Der Maximaldurchmesser des dominanten Follikels der ersten Reifungswelle (DF1) betrug $15,0 \pm 1,6$ mm (LSM \pm SEM; least square mean \pm standard error of the mean). Die Ausbildung des größten Durchmessers des DF1 erfolgte am Tag $10 \pm 1,5$ (LSM \pm SEM) am Tag 9 (Tier 1/5) bzw. am Tag 11 (Tier 1/6). In der Tabelle 16 sind ausgewählte Parameter der Follikelreifungswellen zusammengefasst. Nach der erstmaligen Feststellung des Maximaldurchmessers des DF1 wurde eine deutliche Steigerung der Anzahl kleiner Follikel (um jeweils 14 Follikel) festgestellt.

Der dominante Follikel der zweiten Reifungswelle erreichte am Tag 21 bei einem Tier (Tier 1/5) einen Durchmesser von 12 mm. Das zweite Kontrolltier (Tier 1/6) wies am Tag 21 eine frische Ovulation auf. Bei der vorhergehenden Ultraschalluntersuchung der Ovarien hatte jener Follikel eine Größe von 14 mm. Vermehrte Schleimbildung und Hyperämisierung der Vaginalschleimhaut wurden bei beiden Kontrolltieren schon an den Tagen 19 bzw. 20 beobachtet. Während der Ultraschalluntersuchungen am Tag 21 zeigten sie zudem noch eine verstärkte Tonisierung des Uterus.

Tabelle 16. Parameter zur Beschreibung der Follikelreifungswellen bei den Kontrolltieren mit einem zweiwelligem Follikelwachstum und den Versuchstieren.

| | Kontrolltiere | Versuchstiere |
|--|-------------------------|------------------------|
| Erste Reifungswelle (RW ₁) | | |
| Beginn RW ₁ | Tag 0 / Tag 1 | Tag 1 |
| Anzahl beteiligter Follikel* | 27,0 ± 4,6 | 30,2 ± 2,8 |
| Maximaler Durchmesser des ersten dominanten Follikels (DF 1 _{max})* | 15,0 ± 1,6 | 15,2 ± 1,0 |
| Zeitpunkt der erstmaligen Feststellung des DF 1 _{max} * | 10,0 ± 1,5 | 9,4 ± 0,9 |
| Zweite Reifungswelle (RW ₂) | | |
| Beginn RW ₂ | Tag 11 / Tag 13 | keine Aussage möglich |
| Anzahl beteiligter Follikel* | 36,0 ± 5,4 | keine Aussage möglich |
| Maximaler Durchmesser des zweiten dominanten Follikels (DF 2 _{max})* | 14,0 ± 1,6 ^a | 7,2 ± 1,0 ^b |
| Zeitpunkt der erstmaligen Feststellung des DF 2 _{max} * | 19,0 ± 1,1 | 18,2 ± 0,7 |

* Die Werte repräsentieren LS-Means ± SEM. ^{a,b} kennzeichnet signifikante Differenzen ($p \leq 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

Das Kontrolltier, bei dem ein dreiwelliges Follikelwachstumsverhalten beobachtet wurde, hatte am Tag vor der Ovulation und jeweils an den Tagen 7 bis 11 erhöhte Follikelzahlen in den Kategorien Gesamtanzahl der Follikel und kleine Follikel (< 4 mm). Desweiteren erfolgte am Tag 19 eine erneute Erhöhung der Follikelzahl in den genannten Kategorien. Im Verlauf des Zyklus wurde jeweils im Untersuchungszeitraum nach Feststellung der Erhöhung der Anzahl kleiner Follikel eine Steigerung der Zahl mittelgroßer Follikel beobachtet. An den Tagen 7 und 13 erfolgte jeweils die erstmalige Feststellung des Maximaldurchmessers des ersten bzw. zweiten dominanten Follikels. Der Maximaldurchmesser des dritten dominanten Follikels wurde am Tag 21 gemessen.

Am Ende des Untersuchungszeitraumes fanden wir anhand der makroskopischen Untersuchung der Ovarien nach der Schlachtung bei 71 % (5/7) der Kontrolltiere frische Ovulationen. Die verbleibenden 29 % (2/7) der Kontrolltiere hatten vollständig entwickelte, präovulatorische Follikel mit 13,0 bzw. 18,0 mm Durchmesser ausgebildet.

4.1.3.2 Follikeldynamik der Versuchstiere

Auch die mit Decapeptyl® Depot behandelten Jungrinder zeigten zu Beginn des Untersuchungszeitraumes ein wellenförmiges Follikelwachstum. Mit Hilfe der Ultraschalluntersuchung wurde der Beginn der ersten Follikelreifungswelle am Tag 1 nachgewiesen.

Ab Tag 7 gestaltete sich eine eindeutige Zuordnung der Follikel zu Follikelreifungswellen schwierig, da sich die individuellen Follikelwachstumsverhältnisse bei den Versuchstieren zum Teil erheblich voneinander unterschieden.

An den Tagen 1 bzw. 2, innerhalb der Tage 9 bis 13 und am Tag 21 nach Applikation des GnRH-Agonisten waren bei den Einzeltieren in der Mehrheit vergleichsweise höhere Follikelzahlen aller Follikel und der Follikel < 4 mm als an den übrigen Tagen nachzuweisen. Ein Tier (1/1) wies außerdem Maxima der Follikelanzahl von Follikeln der genannten Kategorien an den Tagen 7, 17 und 21 nach Applikation auf. Zusätzlich trat in einem Fall (Tier 2/4) am Tag 17 ein weiteres Maximum in der Gesamtfollikelanzahl auf.

Bei den Versuchstieren ließ sich in der vorliegenden Studie zwischen den Tagen 1 bis 5 keine inverse Beziehung zwischen der Anzahl kleiner und mittelgroßer Follikel feststellen. Das Absinken der Anzahl mittelgroßer Follikel ab Tag 5 war bei den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren weniger ausgeprägt. Ebenso war kein eindeutig wahrnehmbarer Anstieg der Anzahl mittelgroßer Follikel ab Zyklusmitte zu erkennen.

Die Zahl der Follikel mittlerer Größe (4 bis 8 mm) schwankte im gesamten Untersuchungszeitraum nur geringgradig. Mit Ausnahme des Tages 0 lag sie bei Werten zwischen 2 und 5 Follikeln. Ab Tag 7 sank die Anzahl der Follikel in dieser Kategorie durchschnittlich auf unter 4.

Große Follikel (> 8 mm) traten ab Tag 15 bei den Versuchstieren unregelmäßig auf. Am Tag 21 war bei keinem dieser fünf mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere ein großer Follikel nachweisbar.

Der Beginn der ersten Follikelreifungswelle erfolgte bei 4/5 Tieren (80 %) am Tag 1. Ein Tier (Tier 2/3) zeigte bereits am Tag 0 den Beginn der ersten Follikelreifungswelle. Der maximale Durchmesser des dominanten Follikels der ersten Follikelreifungswelle betrug durchschnittlich $15,2 \pm 2,3$ mm (LSM \pm SEM). Dieses Maximum wurde am Tag $9,4 \pm 0,9$ (LSM \pm SEM) erreicht (bei einem Tier am Tag 7, bei 3 Tieren am Tag 9, bei einem am Tag 13).

In den individuellen Verläufen konnte bei 2 von 7 mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren (Tier 1/4 und Tier 2/4) nach dem Auftreten des Maximaldurchmessers des DF1 ein Anstieg der Anzahl der kleinen Follikel um 10 bzw. 13 Follikel beobachtet werden. Bei den 5 verbleibenden Tieren wurde eine solche Erhöhung im zeitlichen Zusammenhang zum Auftreten des Maximaldurchmessers des DF 1 nicht beobachtet.

Der maximale Durchmesser des größten Follikels der zweiten Reifungswelle betrug bei den Versuchstieren durchschnittlich $7,2 \pm 2,3$ mm (LSM \pm SEM). Das Maximum wurde am Tag $18,2 \pm 1,8$ (LSM \pm SEM) beobachtet (Tabelle 14).

Nach Ablauf von 21 Tagen waren bei den Versuchstieren weder die Entwicklung präovulatorischer Follikel, noch Ovulationen erfolgt. Die größten Follikel der Versuchstiere hatten am Tag 21 eine durchschnittliche Größe von $7,4 \pm 2,5$ mm. Bei 70 % (7/10) mit Decapeptyl® Depot behandelte Jungrinder waren Follikel mit Größen zwischen 3,0 und 8,0 mm sichtbar. Bei 20 % (2/10) der Versuchstiere waren 10-mm-Follikel sichtbar und ein Jungrind (10 %; 1/10) hatte einen Follikel mit 11 mm Durchmesser. Die drei letztgenannten Follikel hatten jedoch verdickte Wände und ihre Konsistenz war nicht so weich, wie das bei präovulatorischen Follikeln normozyklischer Tiere der Fall ist.

4.1.3.3 Vergleich der Follikelzahlen der Kontroll- und Versuchstiere

Da in den eigenen Experimenten bei den Versuchstieren unter dem Einfluss des GnRH-Agonisten jeweils nur zwei dominante Follikel im Verlauf der Untersuchungen beobachtet wurden, sind für eine vergleichende Betrachtung nur die Kontrolltiere benutzt worden, die ebenfalls einen zweiwelligen Follikelwachstumsverlauf aufwiesen.

Die Verteilung der Follikel in den Follikelgrößenklassen ist in den Tabellen A1 bis A4 (siehe Anhang) und in den Abbildungen 12 A bis D aufgeführt. In der Kategorie Gesamtanzahl der Follikel wiesen die **Versuchstiere** am Tag 2 nach Applikation von Decapeptyl® Depot signifikant höhere Werte ($p \leq 0,05$) als die Kontrolltiere auf. Die Anzahl der Follikel in der Kategorie < 4 mm war bei den Versuchstieren an den Tagen 2, 5 und 19 signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht ($p \leq 0,05$).

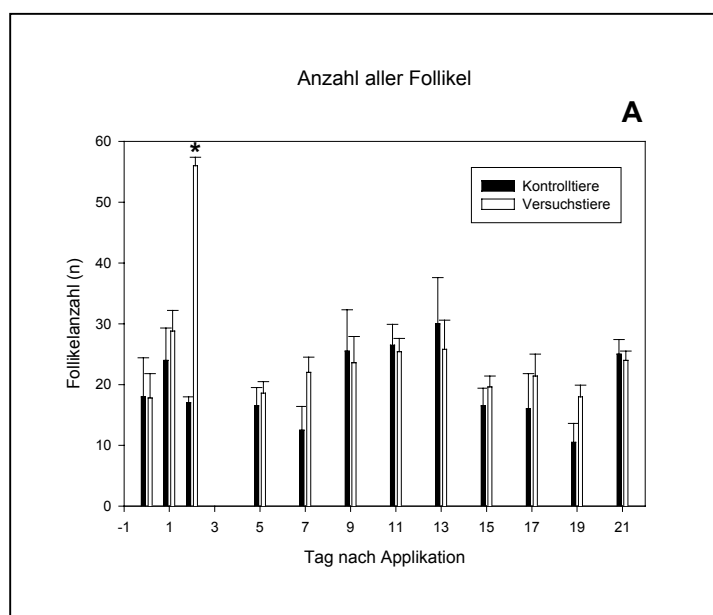


Abbildung 12 A.

Gesamtanzahl der festgestellten Follikel aller Größenklassen bei Kontroll- und Versuchstieren. Die Werte stellen LS-Means \pm SEM dar. * kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

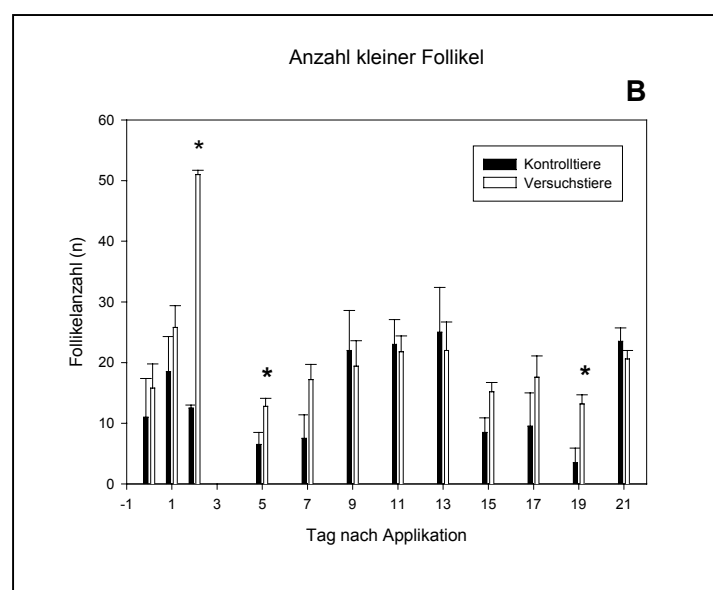


Abbildung 12 B.

Anzahl der kleinen Follikel bei Kontroll- und Versuchstieren. Die Werte stellen LS-Means \pm SEM dar. * kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

Demgegenüber war bei den **Kontrolltieren** die Zahl der mittelgroßen Follikel (4 bis 8 mm) an den Tagen 0 und 15 signifikant ($p \leq 0,05$) höher als bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren. An den Tagen 2, 7 und 21 gab es bei den Kontrolltieren signifikant mehr Follikel > 8 mm ($p \leq 0,05$).

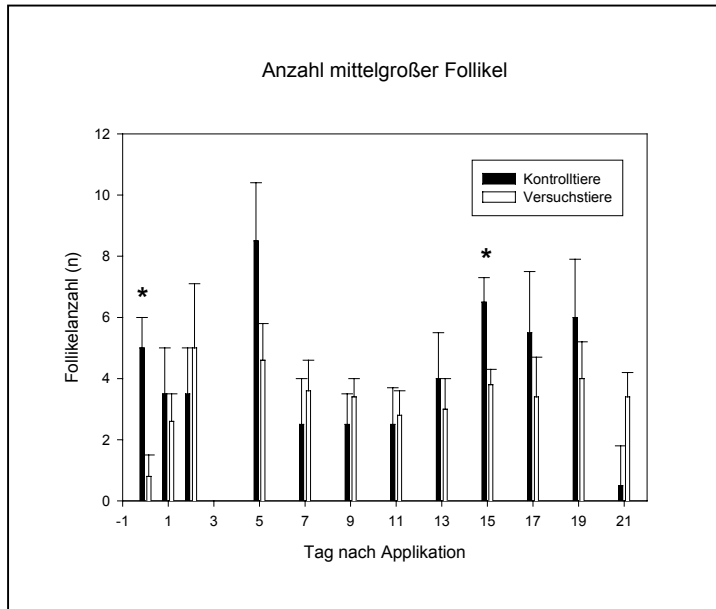


Abbildung 12 C.

Anzahl der mittelgroßen Follikel bei Kontroll- und Versuchstieren. Die Werte stellen LS-Means \pm SEM dar.

* kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

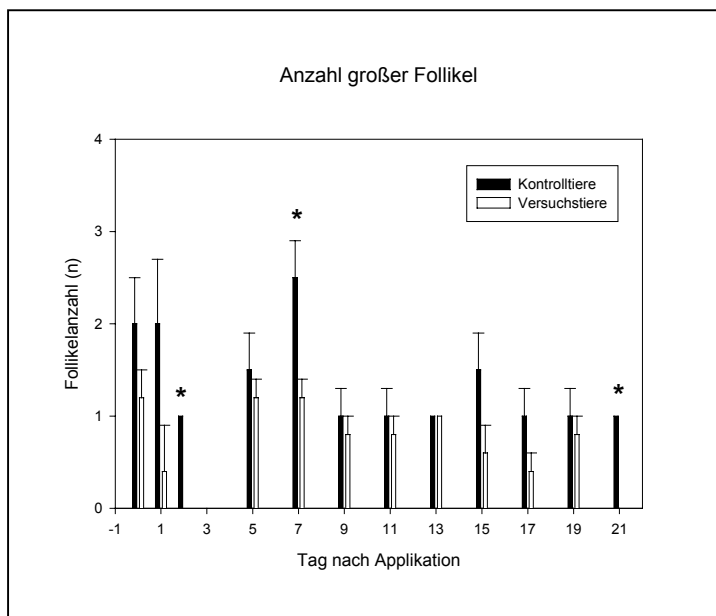


Abbildung 12 D.

Anzahl der großen Follikel bei Kontroll- und Versuchstieren. Die Werte stellen LS-Means \pm SEM dar. * kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

Bei der Auswertung der Follikelzahlen wird deutlich, dass bei Beginn der ersten Follikelreifungswelle keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der beteiligten Follikel zwischen Kontrolltieren und mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren auftraten (Tabelle 16).

In den Kategorien Gesamtanzahl der Follikel, kleine Follikel und mittelgroße Follikel war bei den Kontrolltieren mit zwei Follikelreifungswellen ein bimodales Verhalten ausgeprägt. Die Anzahl der Follikel folgte jeweils einem wellenförmigen Verlauf. In der Tabelle 17 sind die Perioden aufgeführt, die das bimodale Verhalten in den genannten Größenklassen kennzeichnen. In den Abbildungen 11 und 12 A bis D ist dieses bimodale Verhalten ebenfalls zu erkennen.

Tabelle 17. Perioden zur Kennzeichnung des bimodalen Verhaltens der kleinen und mittelgroßen Follikel der Kontrolltiere mit zwei Follikelreifungswellen.

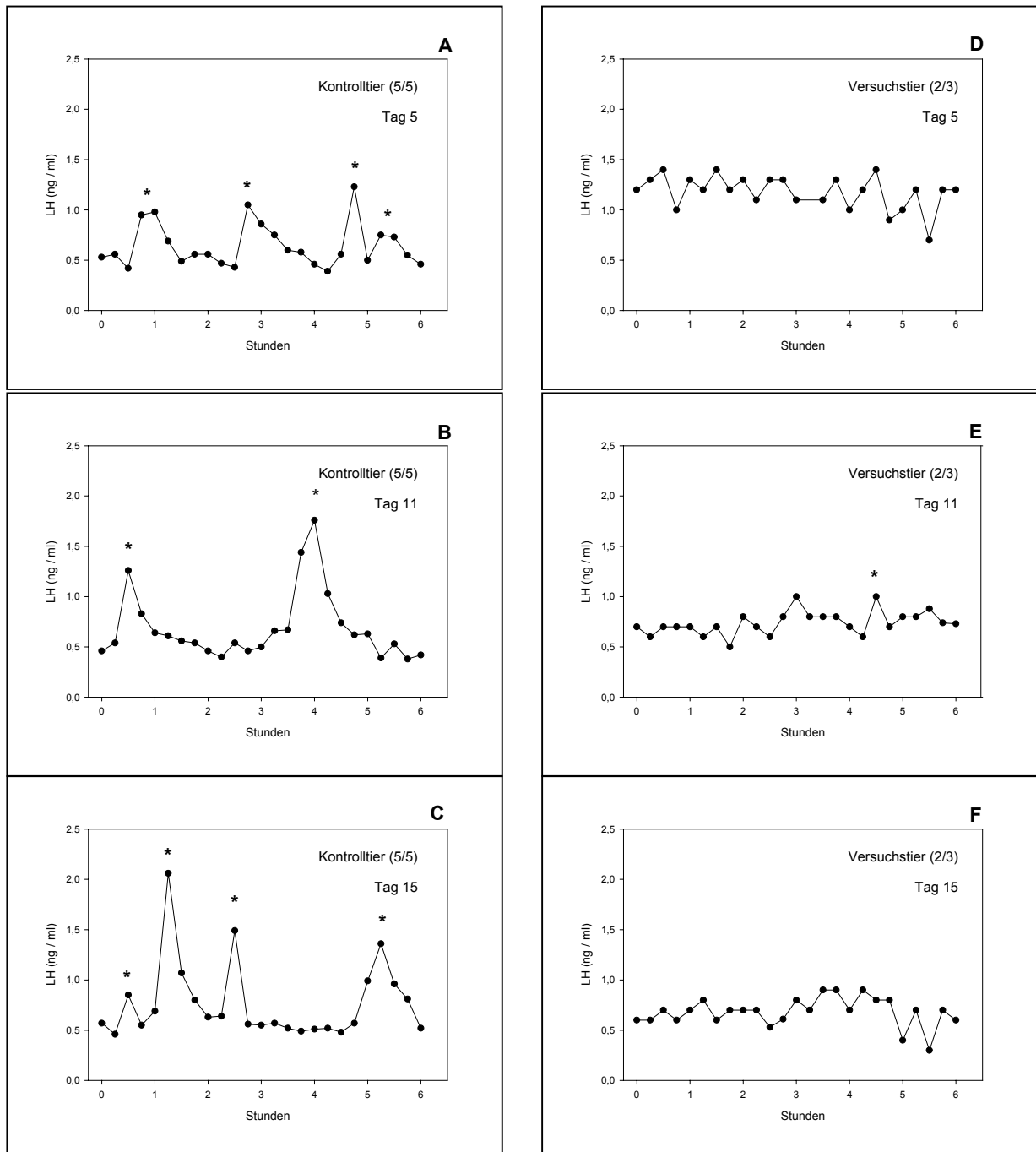
| | Erste Phase | Zweite Phase |
|----------------------|--------------------|---------------------|
| Kleine Follikel | Tag 0 bis 5 | Tag 7 bis 19 |
| Mittelgroße Follikel | Tag 0 bis 11 | Tag 13 bis 21 |

Bei den Versuchstieren wurde dieses wellenförmige Verhalten der Follikelzahlen insbesondere in den Kategorien Gesamtanzahl der Follikel und kleine Follikel von der signifikanten Erhöhung am Tag 2 überlagert, und der wellenförmige Verlauf trat in der Mitte und zum Ende der Versuchsperiode weniger deutlich in Erscheinung.

4.2 Gonadotropinkonzentrationen

4.2.1 Pulsatile LH-Freisetzung

Zur Auswertung der pulsatischen LH-Freisetzung können Daten von allen dafür eingesetzten Tieren verwendet werden, die konkrete Tierzahl für die einzelnen Tage ist jeweils in den Tabellen im Anhang (A5 bis A8) angegeben.



Abbildungen 13 A bis F. Profile individueller pulsativer LH-Sekretion an den Tagen 5, 11 und 15. A, B, C bei einem Kontrolltier (Tier 5/5), D, E, F bei einem Versuchstier (Tier 2/3). Die durch das Pulsdetektionsprogramm ermittelten Pulse sind durch Sterne (*) gekennzeichnet.

Bei der Betrachtung der individuellen Verläufe der LH-Konzentration während der Zeiten der frequenten Blutentnahme sind Unterschiede in der Pulsatilität der LH-Ausschüttung zwischen den beiden Gruppen auffällig. Bei den Kontrolltieren konnte eine pulsatile LH-Ausschüttung beobachtet werden, während unter dem Einfluss des GnRH-Agonisten eine Verringerung bzw. Unterdrückung der Pulsatilität der LH-Sekretion stattfand.

4.2.1.1 Anzahl der LH-Pulse

Bezüglich der Pulsanzahl (Tabelle A5) während der Entnahmeintervalle bestehen signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren an den Tagen 1 (Tiere, welche später ovulierten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen) bis 5, sowie 11 und 15. Die Versuchstiere wiesen immer signifikant geringere Pulsanzahlen als die Kontrolltiere auf ($p < 0,05$). In Abbildung 14 sind die mittleren LH-Pulszahlen an den einzelnen Tagen graphisch dargestellt.

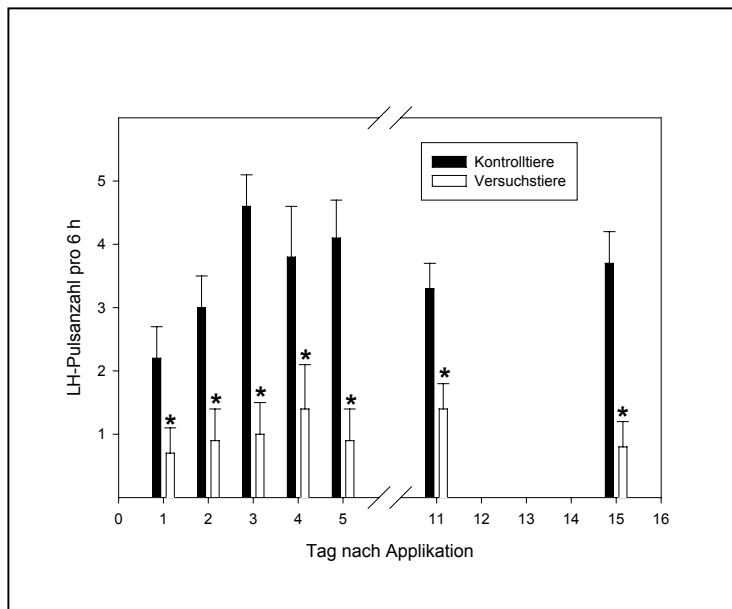


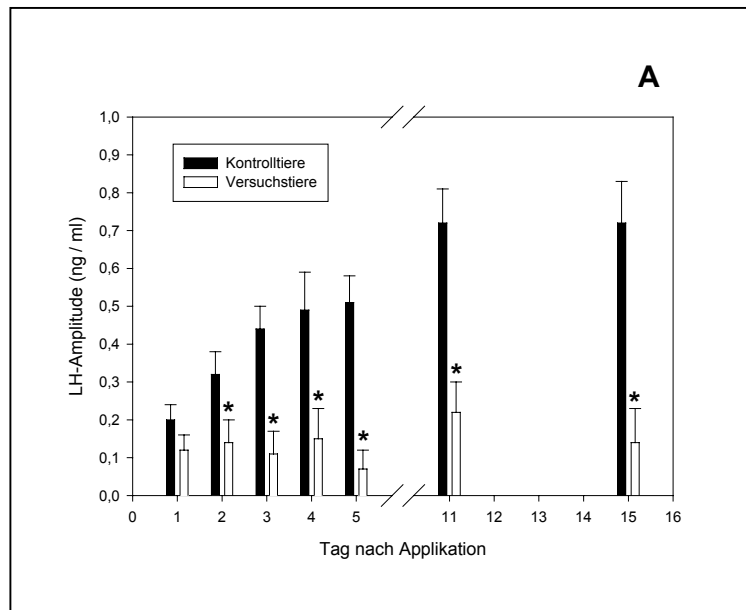
Abbildung 14.

Anzahl der LH-Pulse bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15. Deutlich erkennbar ist eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Anzahl der LH-Pulse an den einzelnen Tagen. Die Werte stellen LS-Means + SEM dar.

* kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

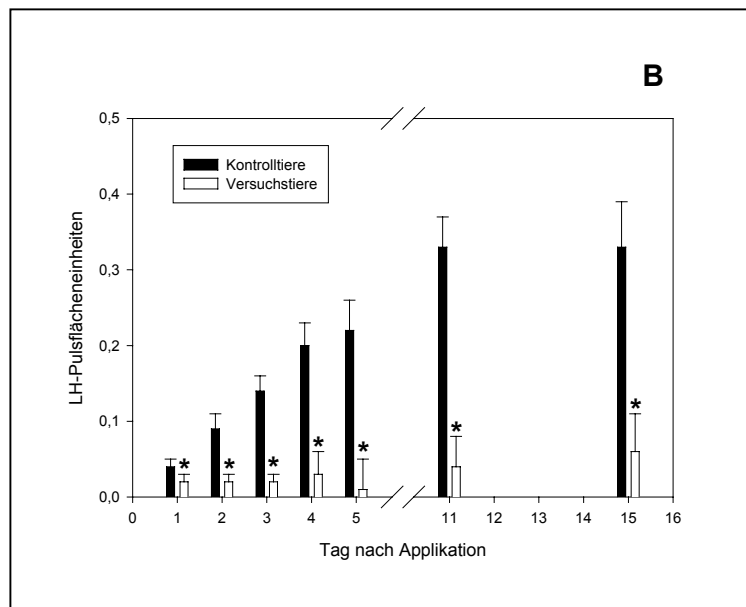
4.2.1.2 Amplituden der LH-Pulse und LH-Pulsflächen

Die Amplituden der LH-Pulse (Abbildung 15 A, Tabelle A6) waren bei den Versuchstieren ab dem Tag 2 signifikant geringer als bei den Kontrollen ($p \leq 0,05$). Ebenso war die Fläche der LH-Pulse (Abbildung 15 B, Tabelle A7) bei den Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 signifikant gegenüber der LH-Pulsfläche bei den Kontrolltieren verringert ($p \leq 0,05$).

**Abbildung 15 A.**

Amplituden der LH-Pulse bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15. Die Werte stellen LS-Means + SEM dar.

* kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

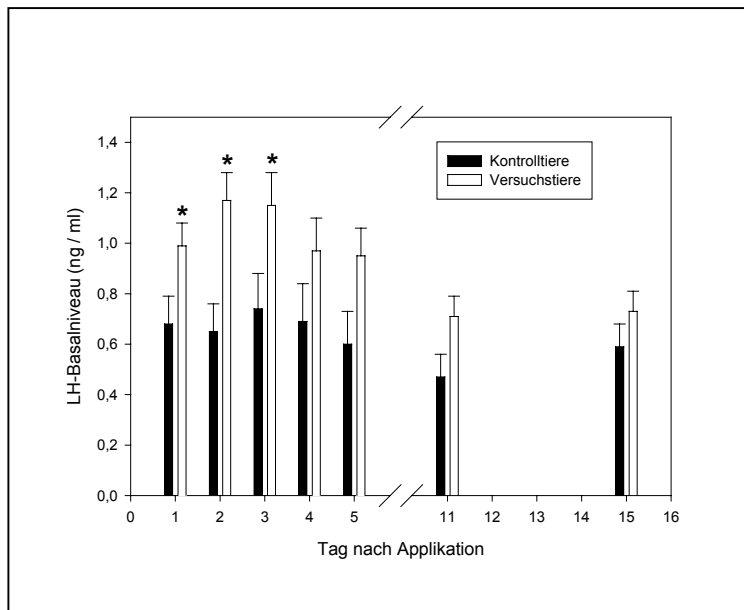
**Abbildung 15 B.**

LH-Pulsflächeneinheiten bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15. Die Werte stellen LS-Means + SEM dar.

* kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

4.2.2 Basale LH-Konzentrationen

Die basalen LH-Konzentrationen von Versuchs- und Kontrolltieren sind in der Abbildung 16 dargestellt. Bei den Versuchstieren ist an den Tagen 1 bis 3 nach Applikation des Decapeptyl® Depot eine signifikante Erhöhung ($p \leq 0,05$) der basalen LH-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrolltieren aufgetreten (Tabelle A8).

**Abbildung 16.**

Basale LH-Konzentrationen bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15. Die Werte stellen LS-Means \pm SEM dar.

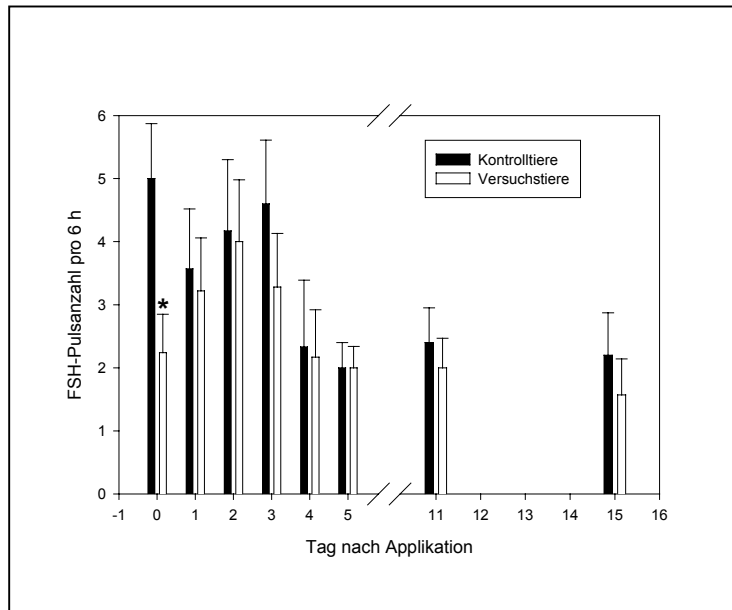
* kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

4.2.3 Pulsatile FSH-Freisetzung

Zur Untersuchung der pulsatischen FSH-Sekretion wurden insgesamt 21 Tiere (14K; 7V) verwendet. Detaillierte Angaben zu den Tierzahlen in Abhängigkeit von der Behandlung und vom Untersuchungszeitpunkt enthalten die Tabellen A9 bis A12 (im Anhang).

4.2.3.1 Anzahl der FSH-Pulse

Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren wurden FSH-Pulse identifiziert (Tabelle A9). Eine signifikant geringere Pulsanzahl ($p \leq 0,05$) konnte bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren am Tag der Applikation festgestellt werden. An den darauffolgenden Untersuchungstagen (Tag 1 bis 5, 11 und 15) war die Zahl der FSH-Pulse bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren in der Tendenz ebenfalls geringer als bei den Kontrolltieren. Darüber hinaus war an den Tagen 1 bis 3 in beiden Gruppen eine höhere Pulsanzahl pro 6 Stunden aufgetreten, als an den Tagen 5, 11 und 15. In der Abbildung 17 sind die Pulsanzahlen für die Gruppen an den einzelnen Tagen dargestellt.

**Abbildung 17.**

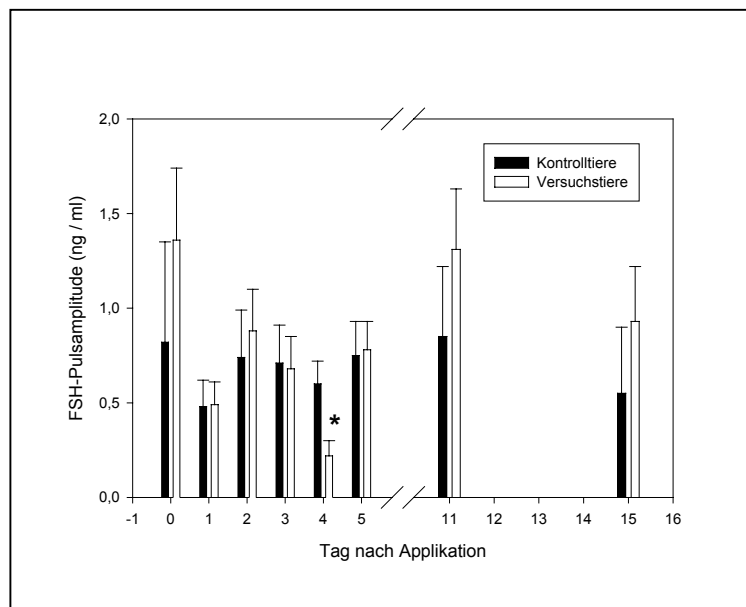
Anzahl der FSH-Pulse bei den Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 0 bis 5, 11 und 15. Die Werte stellen LS-Means + SEM dar.

* kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

Die Versuchstiere hatten am Tag 0 eine signifikant geringere Anzahl an FSH-Pulsen als die Kontrolltiere ($p \leq 0,05$).

Desweiteren lag die Pulsanzahl in beiden Gruppen an den Tagen 1 bis 3 über den Werten der Tage 4, 5, 11 und 15.

4.2.3.2 Amplituden der FSH-Pulse und FSH-Pulsflächen

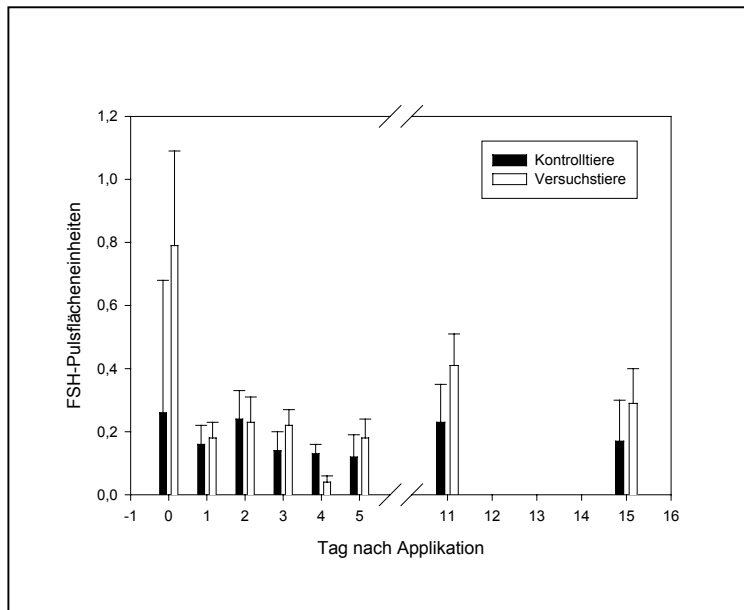
**Abbildung 18.**

FSH-Pulsamplituden bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 0 bis 5, 11 und 15. Die Werte stellen LS-Means + SEM dar.

* kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

Bezüglich dieses Merkmals sind im vorliegenden Versuch am Tag 4 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufgetreten.

Die durchschnittliche Höhe der FSH-Pulsamplituden war bei den Versuchstieren am Tag 4 signifikant geringer als bei den Kontrolltieren. An den anderen Tagen konnten keine signifikanten Differenzen festgestellt werden. Bezüglich der FSH-Pulsflächen sind keine signifikanten Differenzen zwischen Kontroll- und Versuchstieren feststellbar (Tabellen A10 und A11 im Anhang). In den Abbildungen 18 und 19 sind die ermittelten Werte für die FSH-Pulsamplituden und -flächen dargestellt.

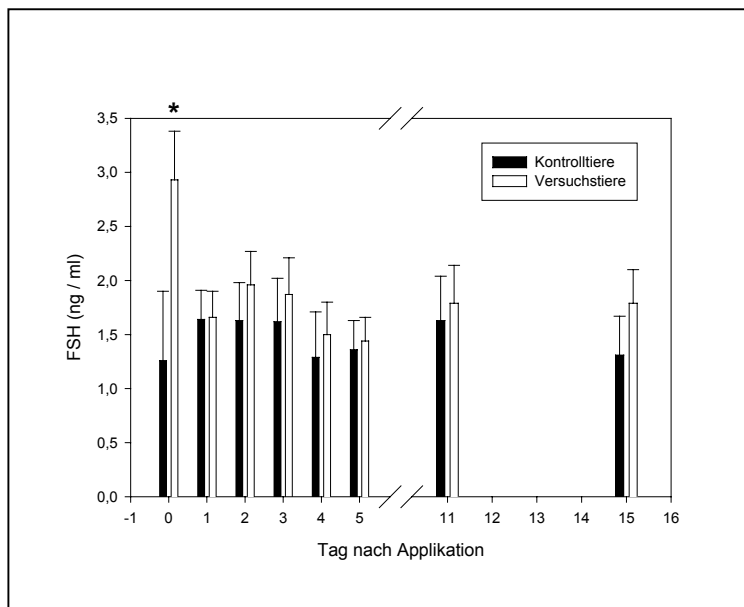
**Abbildung 19.**

FSH-Pulsflächeneinheiten bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 0 bis 5, 11 und 15. Die Werte stellen LS-Means \pm SEM dar.

Auffällig ist eine stark erhöhte FSH-Pulsfläche der Versuchstiere am Tag der Applikation des GnRH-Agonisten. Aufgrund der hohen Variation des Merkmals konnte die Mittelwertdifferenz am Tag 0 jedoch statistisch nicht gesichert werden

4.2.4 Basale FSH-Konzentrationen

Bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren war am Tag 0 ein signifikant höheres Basalniveau im Vergleich zu den Kontrolltieren nachzuweisen (Abbildung 20, Tabelle A12).

**Abbildung 20.**

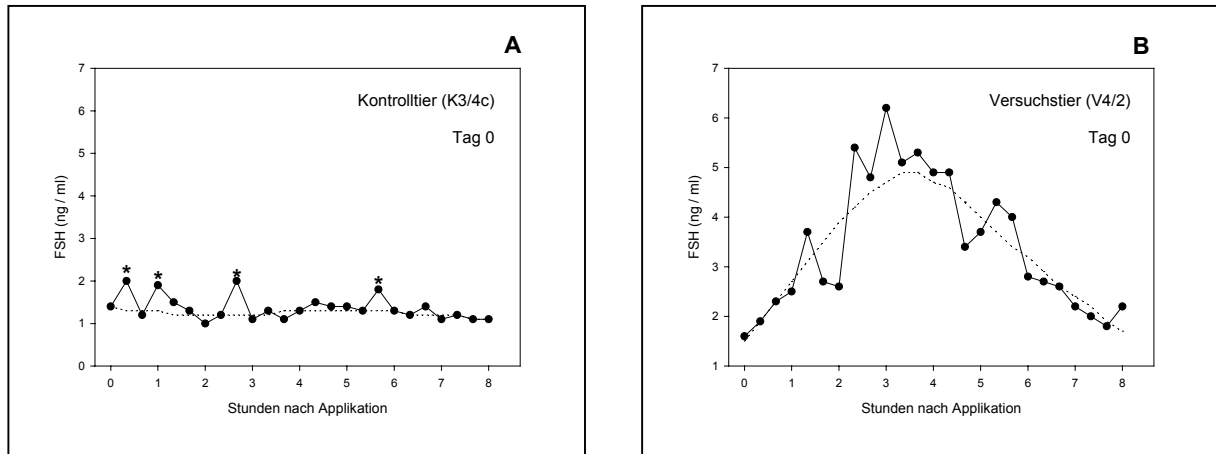
Basale FSH-Konzentrationen der Kontroll- und Versuchstiere an den Tagen 0 bis 5, 11 und 15. Die Werte stellen LS-Means \pm SEM dar.

* kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Kontroll- und Versuchstieren.

In 10 von 14 Fällen konnte unmittelbar nach der Applikation des GnRH-Agonisten eine deutliche Erhöhung der basalen FSH-Konzentration im Sinne eines FSH-Gipfels festgestellt

werden. Dabei kam es zu Maximalwerten bis zu 27 ng/ml. Die Steigerungen betrugen das doppelte bis dreizehnfache gegenüber dem FSH-Ausgangsniveau (dem vorangegangenen niedrigsten Wert). Die Maxima wurden zwischen 2 und 3,5 Stunden nach der Applikation erreicht. Dem Ausgangsniveau entsprechende Werte wurden 5 bis 6 Stunden nach der Applikation wieder erreicht.

Die basale FSH-Konzentration der Kontrolltiere zeigte innerhalb des Untersuchungszeitraumes keine gerichteten Veränderungen. In den Abbildungen 21 A und B sind Beispiele des Verlaufs von FSH-Konzentrationen bei einem Kontroll- und einem Versuchstier am Tag 0 dargestellt.



Abbildungen 21 A und B. Typischer Verlauf der FSH-Konzentration am Tag der Applikation des GnRH-Agonisten/Lösungsmittels bei einem Kontroll- und einem Versuchstier. Die Stunden 0 bis 8 nach Applikation entsprechen dem Intervall der frequenten Blutentnahme von 8.00 bis 14.00 Uhr. Die unterbrochene Linie kennzeichnet die vom Pulsdetektionsprogramm PULSAR errechnete Basallinie der FSH-Konzentration, während die errechneten Pulse durch Sterne (*) markiert sind.

4.3 Steroidhormonkonzentrationen

4.3.1 Progesteron (P₄)

Bei den Kontrolltieren erfolgte der Beginn des P₄-Anstieges am Tag 2 nach Applikation des Lösungsmittels. Bezogen auf den Ablauf des normalen Zyklus bedeutet dies, dass die P₄-Konzentrationen am Tag 2 nach der Brunst zu steigen begannen. Auch bei den Versuchstieren (Abbildung 22) erfolgte der Anstieg ab dem zweiten Tag nach der Applikation des Decapeptyl® Depot. Die Versuchstiere zeigten einen steileren P₄-Anstieg als die Kontrolltiere. Desweiteren dauerte der Anstieg bei den Kontrolltieren bis zum Tag 11, während die Progesteronkonzentration der Versuchstiere nur bis zum Tag 10 stieg. Die sich anschließende Plateauphase war bei den Versuchstieren 7 Tage lang, während sie bei den Kontrolltieren 4 Tage dauerte. Demzufolge begann der Progesteronabfall bei den Kontrolltieren am Tag 16, während die Progesteronkonzentrationen bei den Versuchstieren ab Tag 18 sanken. Die Kontrolltiere hatten an den Tagen 0 und 1 signifikant ($p \leq 0,05$) höhere Progesteronwerte als die Versuchstiere. Bei den Versuchstieren wurden hingegen an den Tagen 17 bis 19 signifikant ($p \leq 0,05$) höhere Progesteronkonzentrationen als bei den Kontrolltieren nachgewiesen. An den Tagen 7 bis 16 waren die P₄-Konzentrationen der Versuchstiere zwar stets höher als die der Kontrolltiere, jedoch konnten die Unterschiede statistisch nicht gesichert werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) für die Tage 7 bis 16 lagen zwischen 0,11 und 0,27.

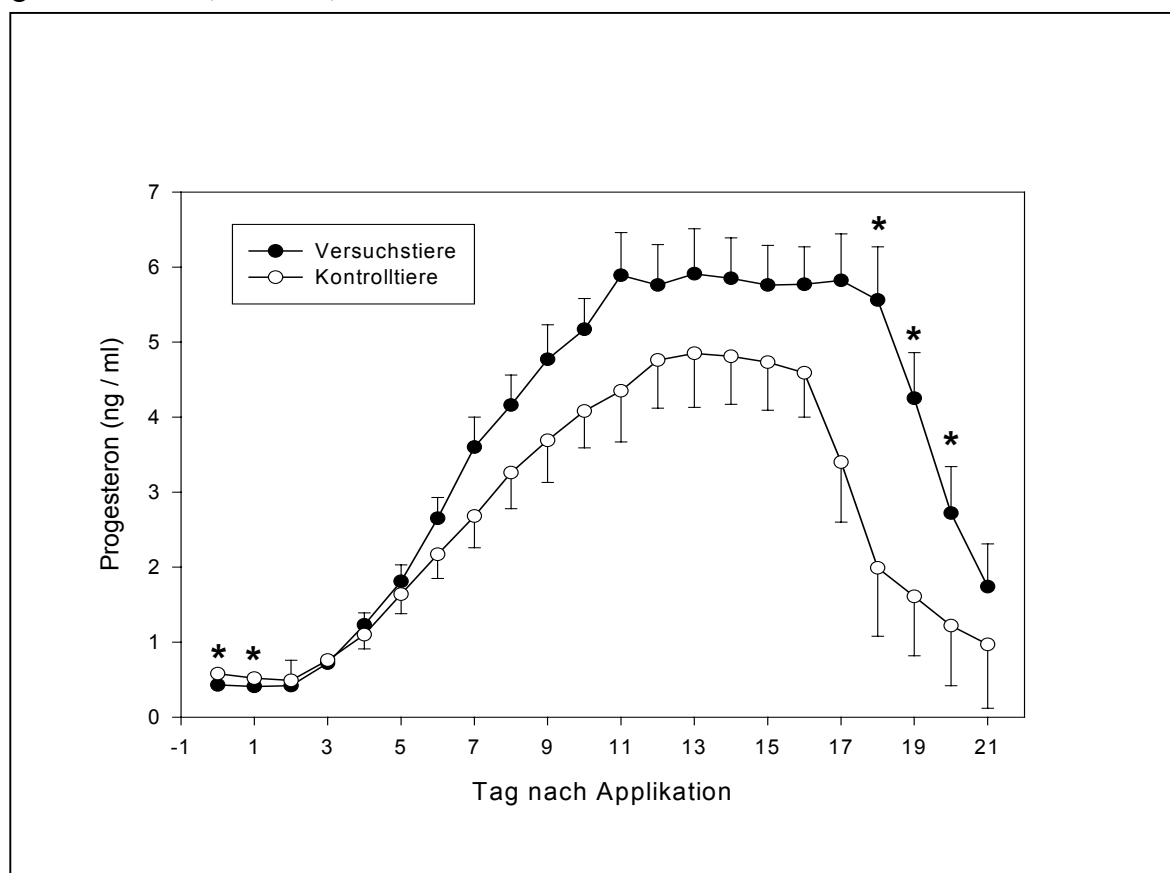


Abbildung 22. Progesteronkonzentrationen bei Versuchs- und Kontrolltieren ($n = 10$ V, $n = 7$ K) von Tag 0 (Tag der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel) bis Tag 21. Die Werte stellen LS-Means \pm SEM dar. * bezeichnet signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

Insgesamt hatten 86 % (6/7) der Kontrolltiere am Versuchsende Progesteronwerte unter 1 ng/ml. Bei 57 % (4/7) wurde dieser Grenzwert am Tag 18 erreicht, während zwei Tiere (29 %) am Tag 19 die genannte Grenze unterschritten. Ein Tier (14 %, Tier-Nr. 5/6) hatte noch am Tag 21 einen Progesteronwert von 1,86 ng/ml.

Am Ende des Untersuchungszeitraumes wiesen 70 % (7/10) der mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere einen Progesteronwert unter 1 ng/ml auf. Bei 6 von 10 Versuchstieren (60 %) sanken die Progesteronwerte am Tag 21 unter 1 ng/ml, während ein Tier (10 %) diesen Grenzwert bereits am Tag 20 erreichte. Bei 30 % der Versuchstiere waren am Tag 21 noch Progesteronwerte zwischen 3 und 6 ng/ml in der Vena cava caudalis nachweisbar.

Um eine statistische Aussage zur Qualität des Anstieges der Progesteronkonzentrationen zu erhalten, wurde die Differenz der Progesteronwerte zwischen Tag 11 und Tag 2 für jedes Tier gebildet und die mittleren Differenzen von Kontroll- und Versuchstieren wurden miteinander verglichen. Die Versuchstiere hatten eine deutlich höhere Differenz (K: $3,86 \pm 0,65$ ng/ml; V: $5,47 \pm 0,55$ ng/ml; $p = 0,08$).

Die Progesteronkonzentration der Kontrolltiere begann ab Tag 16 signifikant zu sinken, während dies bei den Versuchstieren erst ab Tag 18 der Fall war. Der Abfall der Progesteronwerte ist gesondert in Abbildung 23 und Tabelle A14 dargestellt.

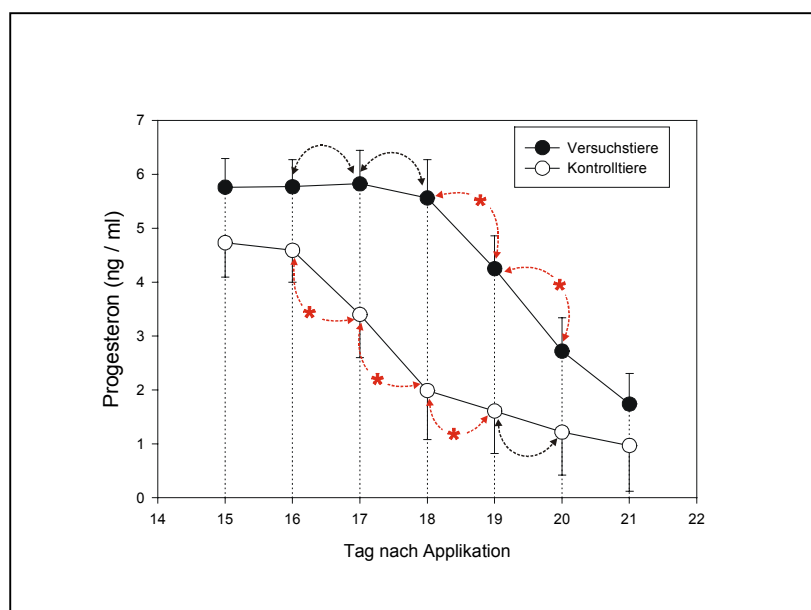


Abbildung 23.

Abfallen der Progesteronwerte der Kontroll- und Versuchstiere am Ende des Untersuchungszeitraumes.

* kennzeichnet signifikante Verringerung der Progesteronkonzentration

Die Ergebnisse der Analyse der wiederholten Messungen (Repeated-Analyse) für verschiedene Zeiträume sind in Tabelle 18 dargestellt. Aus den Werten ist zu entnehmen, dass der Faktor „Tag“ in den Perioden des Anstieges und des Abfallens der Progesteronkonzentration einen signifikanten Einfluss hat ($p \leq 0,05$). Für den Faktor „Behandlung mit Decapeptyl® Depot“ konnte im Zeitraum der Tage 17 bis 19 eine signifikante Einflussnahme festgestellt werden ($p \leq 0,05$). In den Phasen des Anstieges und des Plateaus konnte in den vorliegenden Untersuchungen kein signifikanter Behandlungseinfluss festgestellt werden.

Tabelle 18. Ergebnisse der Repeated-Analyse zum Einfluss der Faktoren „Tag“ und „Behandlung mit Decapeptyl® Depot“ während des Anstieges, der Plateauphase und des Abfallens der Progesteronkonzentration

| Physiologischer Abschnitt | Zeitraum (Tage) | Einfluss der Faktoren (p) | | |
|---------------------------|-----------------|---------------------------|------------------|------------|
| | | Tag | Tag x Behandlung | Behandlung |
| P ₄ -Anstieg | 8 bis 10 | 0,01 | 0,86 | 0,12 |
| Plateauphase | 11 bis 16 | 0,05 | 0,48 | 0,19 |
| P ₄ -Abfall | 17 bis 19 | 0,01 | 0,02 | 0,01 |
| | 20 bis 21 | 0,02 | 0,65 | 0,45 |

4.3.2 Estradiol-17 β (E₂)

Bei der Darstellung, statistischen Bearbeitung und Bewertung der Estradiolkonzentrationen muss beachtet werden, dass diese in starkem Maße von der individuell geprägten Follikelentwicklung beeinflusst werden.

Die durchschnittlichen basalen Konzentrationen des Estradiol-17 β lagen bei den Kontrolltieren zwischen 5 und 14 pg/ml. Bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren lagen die durchschnittlichen basalen Konzentrationen des Estradiol-17 β zwischen 5 und 16 pg/ml.

4.3.2.1 Estradiolkonzentration vor bzw. nach dem LH-Gipfel

Bei individueller Auswertung aller Kontrolltiere (13/13) war im Zeitraum von 48 Stunden vor dem LH-Gipfel ein Anstieg der Konzentration von Estradiol-17 β in der Vena cava caudalis im Vergleich zu den vorangegangenen Basalwerten nachzuweisen. Ebenfalls bei allen zur Auswertung zur Verfügung stehenden Versuchstieren (15/15) war ein solcher Anstieg der Konzentration von Estradiol-17 β in diesem Zeitraum zu beobachten. Die ermittelte Differenz bei den Kontrolltieren unterscheidet sich nicht signifikant ($p = 0,24$) von der bei den Versuchstieren.

Innerhalb der dem LH-Gipfel folgenden 24 bis 48 Stunden kam es bei allen Kontrolltieren (15/15) zu einem Abfall der Estradiol-17 β -Konzentrationen im Vergleich zu den vorangegangenen Maximalwerten. Bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren (19/19) war ein solcher Abfall ebenfalls nachzuweisen. Der Betrag, um den die Estradiol-17 β -Konzentration bei den Kontrolltieren gefallen ist, unterscheidet sich nicht signifikant ($p = 0,48$) von dem der mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere. In der Tabelle 19 sind die durchschnittlichen Differenzen, welche die Erhöhung bzw. den Abfall der Estradiol-17 β -Konzentration vor bzw. nach dem LH-Gipfel beschreiben, dargestellt.

Tabelle 19. Durchschnittliche Erhöhung/Erniedrigung der Estradiol-17 β -Konzentrationen vor/nach dem LH-Gipfel bei Kontroll- und Versuchstieren. Die Werte sind LS-Means \pm SEM.

| | Kontrolltiere | Versuchstiere |
|--|----------------------|----------------------|
| E ₂ -Erhöhung vor dem LH-Gipfel (pg/ml) | 6,0 \pm 1,5 | 8,6 \pm 1,5 |
| E ₂ -Abfall nach dem LH-Gipfel (pg/ml) | 7,9 \pm 1,5 | 6,5 \pm 1,3 |

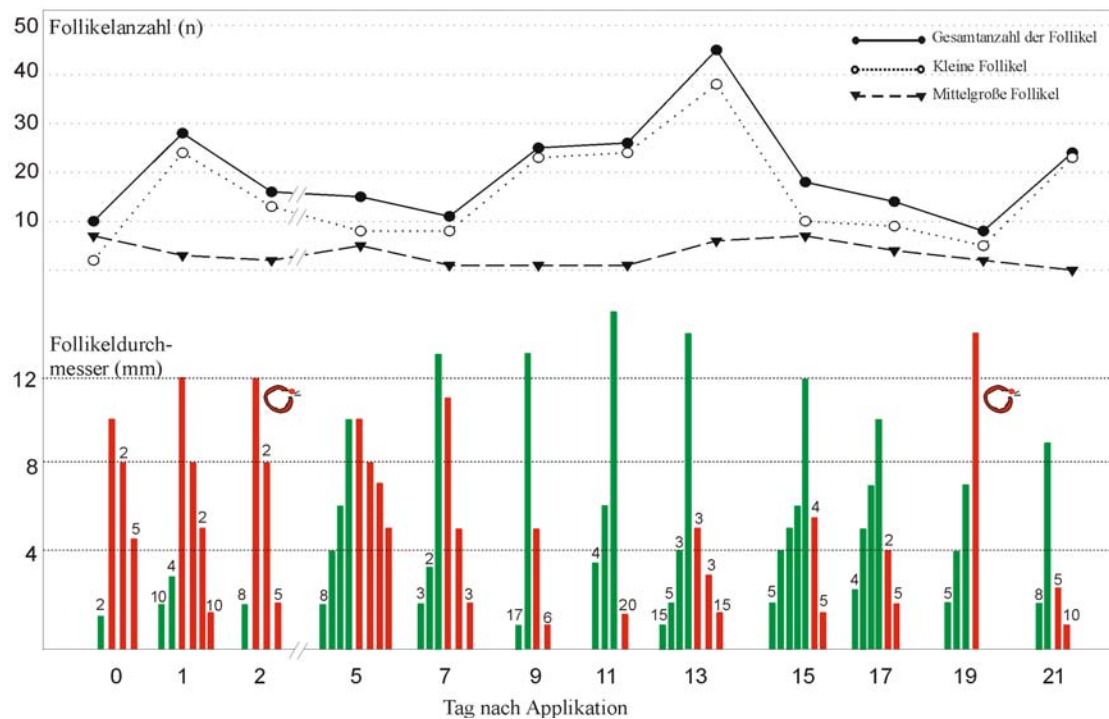
4.3.2.2 Estradiolkonzentration im Verlauf des Zyklus

Nach der Ovulation wurden bei den Kontrolltieren für 1 bis 3 Tage niedrige Konzentrationen an Estradiol-17 β beobachtet. Etwa ab Tag 4 erfolgte ein Anstieg des Gehaltes an Estradiol-17 β . Die Höhe des Anstieges war individuell sehr verschieden und bewegte sich zwischen 2 und 12 pg/ml. Im Zeitraum vom Tag 8 bis 10 war erneut ein Abfall der Estrogenkonzentration zu beobachten. Bei 86 % (6/7) der Kontrolltiere konnte nach dem Absinken der Progesteronwerte unter 1 ng/ml (an den Tagen 18 und 19) innerhalb der folgenden 24 Stunden ein Anstieg der Konzentration des Estradiol-17 β festgestellt werden. Lediglich ein Tier (14 %; Tier-Nr. 5/6) zeigte einen solchen Anstieg nicht.

Auch bei den Versuchstieren traten Schwankungen der Konzentration an Estradiol-17 β während des Zyklus auf. In der ersten Zyklushälfte waren diese Konzentrationsänderungen teilweise mit dem Follikelwachstum in Zusammenhang zu bringen. Gegen Ende der Versuchsperiode nahm die Intensität der Schwankungen des Estrogengehaltes bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren ab. An den Tagen 21 bzw. 22 wiesen 5 von 10 Versuchstieren im Vergleich zum Tag 0 niedrigere Basalkonzentrationen von Estradiol-17 β auf. Bei drei von 10 Versuchstieren waren am Ende der Versuchsperiode keine Unterschiede im Vergleich zum Tag 0 feststellbar, während zwei Tiere eine Erhöhung aufwiesen.

In den Abbildungen 24 und 25 ist der Verlauf der Follikelentwicklung und der Konzentration der Gonadotropine und Steroide bei Kontroll- und Versuchstieren an je einem Beispiel zusammenfassend dargestellt.

Verlauf der Follikelentwicklung und der Hormonkonzentrationen bei einem Kontrolltier (1/6)



Kontrolltier (1/6)

Konzentration der Gonadotropine

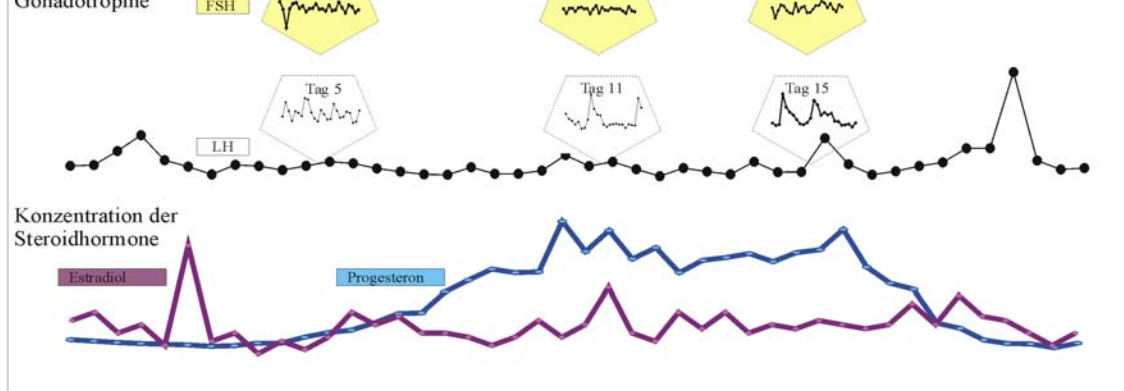
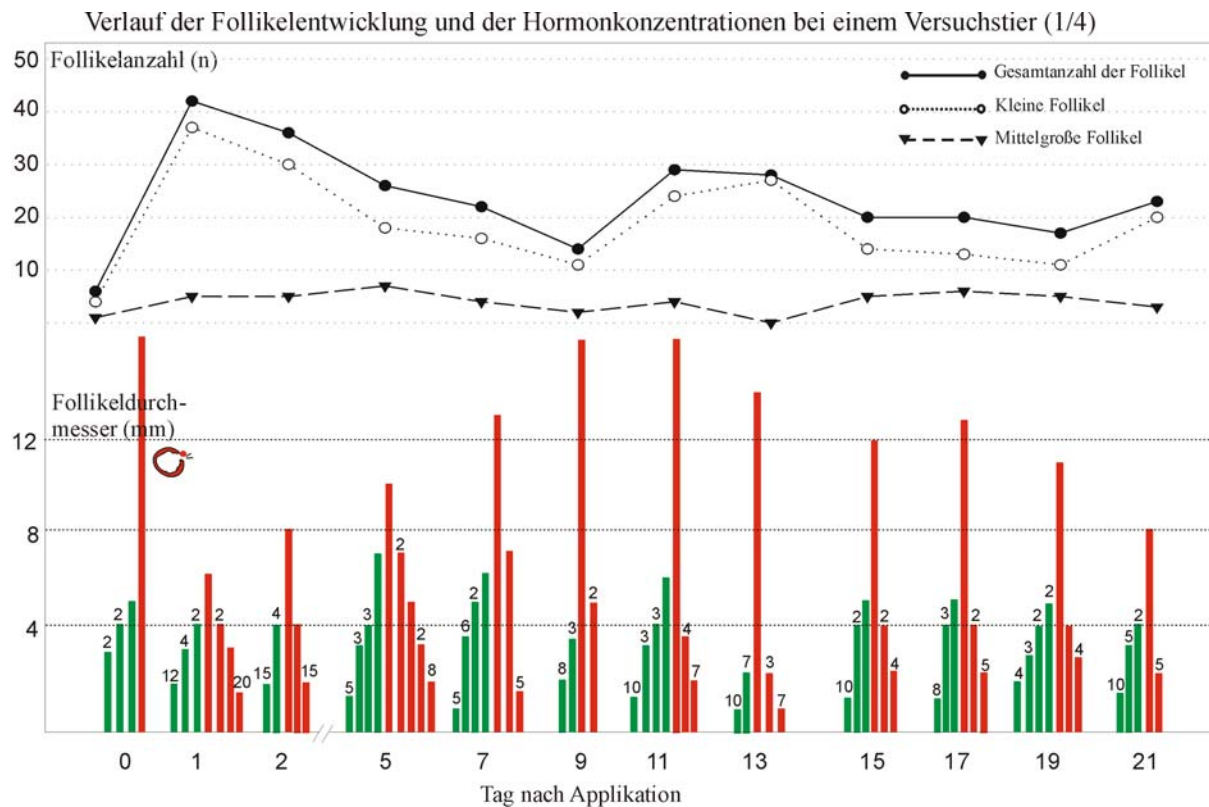


Abbildung 24. Darstellung des typischen Verlaufes der Follikelentwicklung und der korrespondierenden Hormonkonzentrationen eines Kontrolltieres (Tier 1/6). Das Liniendiagramm im oberen Teil der Abbildung verdeutlicht den Verlauf der zahlenmäßigen Entwicklung in den Kategorien der kleinen (gepunktete Linie) und mittelgroßen Follikel (gestrichelte Linie), sowie der Gesamtanzahl der Follikel (durchgezogene Linie). Im darunterliegenden Säulendiagramm ist die tatsächliche Größe und Lokalisation (grün = Follikel des linken Ovars, rot = Follikel des rechten Ovars) dargestellt. Die Zahlen auf den Säulen geben die konkrete Anzahl der in der entsprechenden Größe gefundenen Follikel an. Steht keine Zahl auf der Säule, so ist ein Follikel dieser Größe vorhanden. Beide Arten der Darstellung verdeutlichen den wellenförmigen Follikelwachstumsverlauf. ♂ kennzeichnet die Ovulation eines Follikels. Die pulsatile Ausschüttung der Gonadotropine an den Tagen 5, 11 und 15 ist in den fünfjährigen Fenstern dargestellt (gelb = FSH, weiß = LH). Darunter ist der LH-Verlauf (durchgezogene schwarze Linie mit Punkten) während der gesamten Untersuchungsperiode gezeigt. Deutlich erkennbar ist der präovulatorische LH-Gipfel am Ende der Untersuchungszeitraumes. Im unteren Teil der Abbildung ist der Verlauf der Steroidhormonkonzentrationen dargestellt (violett = Estradiol, blau = Progesteron).



Versuchstier (1/4)

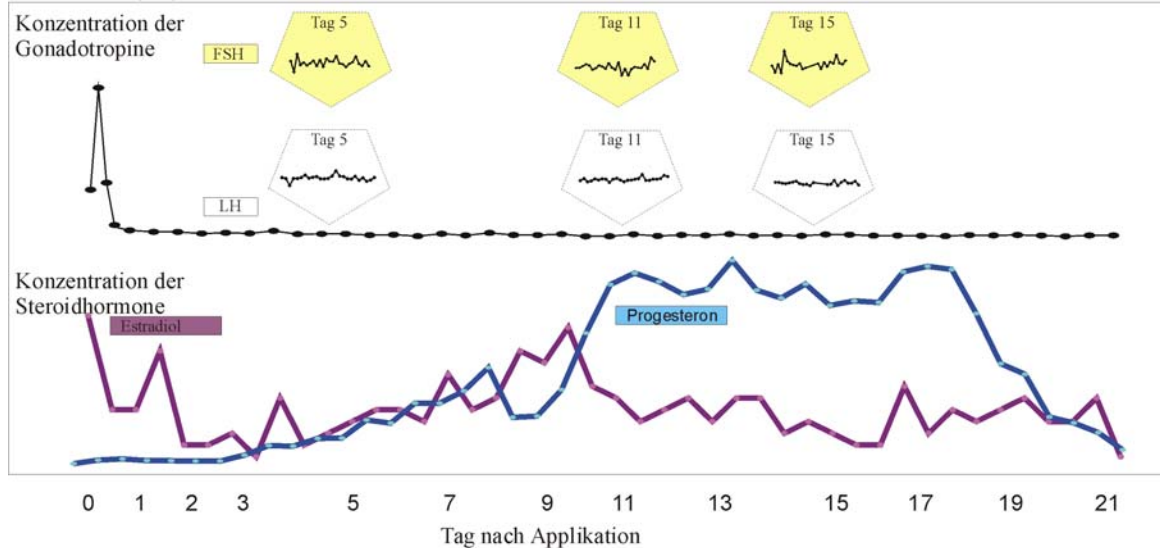


Abbildung 25. Darstellung des typischen Verlaufes der Follikelentwicklung und der korrespondierenden Hormonkonzentrationen eines Versuchstieres (Tier 1/4). Das Liniendiagramm im oberen Teil der Abbildung verdeutlicht den Verlauf der zahlenmäßigen Entwicklung in den Kategorien der kleinen (gepunktete Linie) und mittleren Follikel (gestrichelte Linie), sowie der Gesamtanzahl der Follikel (durchgehende Linie). Im darunterliegenden Säulendiagramm ist die tatsächliche Größe und Lokalisation (grün = Follikel des linken Ovars, rot = Follikel des rechten Ovars) dargestellt. Die Zahlen auf den Säulen geben die konkrete Anzahl der in der entsprechenden Größe gefundenen Follikel an. Steht keine Zahl auf der Säule, so ist ein Follikel dieser Größe vorhanden. ⦿ kennzeichnet die Ovulation eines Follikels. Am Ende der Versuchsperiode erfolgte keine Ovulation und es war auch kein präovulatorischer Follikel ausgebildet. Die pulsatile Ausschüttung der Gonadotropine an den Tagen 5, 11 und 15 ist in den fünfeckigen Fenstern dargestellt (gelb = FSH, weiß = LH). Darunter ist der LH-Verlauf (durchgehende schwarze Linie mit Punkten) während der gesamten Untersuchungsperiode gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung ist der Verlauf der Steroidhormonkonzentrationen abgebildet (violett = Estradiol, blau = Progesteron).

5 Diskussion

Die Applikation von langzeitaktiven GnRH-Agonisten ist eine relativ neue Methode zum Studium des Einflusses der Gonadotropine FSH und LH auf die Prozesse des Follikelwachstums und der Follikelreifung. Für den Einsatz langzeitaktiver GnRH-Analoga sprechen eine Reihe bedeutsamer Aspekte:

- (1) Die zuverlässige Induktion von Vorgängen durch die Applikation.
- (2) Durch die Verfügbarkeit unterschiedlicher Implantate oder Minipumpen besteht die Möglichkeit der Variation bezüglich Dosis und/oder Zeit der Exposition.
- (3) Die durch den Einsatz von GnRH-Analoga bedingten Veränderungen sind reversibel.
- (4) Langzeitaktive GnRH-Analoga zeichnen sich durch eine gute Tierverträglichkeit aus.

Der in der vorliegenden Untersuchung eingesetzte GnRH-Agonist in Langzeitformulierung (Decapeptyl® Depot) ermöglicht dem Anwender - ebenso wie ein kurzzeitaktiver GnRH-Agonist - die Induktion von Ovulationen bei zyklischen Jungtieren.

LH-Gipfel/Ovulationen

Bei 67 % der Kontrolltiere ist es gelungen, den endogenen **LH-Gipfel** teilweise während der Zeit der frequenten Blutentnahme nachzuweisen. Diese endogenen LH-Gipfel erfolgten innerhalb der Tage 0 bis 2. Aufgrund des Versuchsdesigns ist es in der vorliegenden Studie nicht möglich, quantitative Aussagen über die Höhe des endogenen LH-Gipfels bei den Kontrolltieren und dessen Dauer zu treffen. Jedoch ist es unter Einbeziehung aller zur Verfügung stehenden Daten möglich, Rückschlüsse auf die Zeitspanne zu ziehen, in der sich der LH-Gipfel der Kontrolltiere ereignet haben muss. BERGFELT und Mitarb. (1997) geben an, dass zwischen dem endogenen LH-Peak und der Ovulation etwa 24 bis 36 Stunden vergehen. Unter Beachtung dieser Zeitspanne und der Kenntnisse über den Ovulationszeitraum kann davon ausgegangen werden, dass der endogene LH-Gipfel bei zwei Tieren am Tag 0, bei einem Tier am Tag 1 und bei den restlichen zwei Tieren (am Morgen des Tages) Tag 2 erfolgte. WALTERS und SCHALLENBERGER (1984) beobachteten den LH-Gipfel (mit 7 bis 32 ng/ml) 59 ± 2 Stunden nach der Applikation eines Prostaglandin-Analogons. Desweiteren gaben sie die Dauer des LH-Gipfels unbehandelter Tiere mit 6 bis 10 Stunden an. Die Zeitdauer von der Induktion der Luteolyse bis zum LH-Gipfel war bei den Kontrolltieren identisch mit der von anderen Autoren beschriebenen. So fanden KANITZ und Mitarb. (1996), dass 75 % der Tiere 22 Stunden nach dem LH-Gipfel, welcher 63 bis 76 Stunden nach der Luteolyseinduktion erfolgte, ovulierten.

Alle mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere hatten einen induzierten LH-Gipfel, welcher sein Maximum von bis zu 78 ng/ml etwa 3 Stunden nach der Applikation erreichte. Die Rückkehr der LH-Konzentrationen auf Werte zwischen 1 und 2 ng/ml war bei allen Versuchstieren am Morgen des Tages 1 post applicationem abgeschlossen. Bezüglich der Dauer und Ausprägung des induzierten LH-Gipfels ist eine Übereinstimmung der eigenen Ergebnisse mit den in den nachfolgend angeführten Studien vorhanden (MEE und Mitarb., 1993; GONG und Mitarb., 1995; 1996; BERGFELD und Mitarb., 1996a,b; D'OCCHIO und Mitarb., 1996 und RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998).

In der vorliegenden Studie wurden bei den Kontrolltieren 80 % der **Ovulationen** im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden nach dem LH-Gipfel ultrasonographisch festgestellt. Die verbleibenden 20 % der Ovulationen wurden 72 Stunden nach dem LH-Gipfel ultrasonographisch verifiziert. Die Mehrzahl der Kontrolltiere ovulierte demzufolge an den Tagen 0 bis 1 bzw. 1 bis 2. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die bei Verabreichung von Prostaglandin am Zyklustag 7 gewonnen wurden (SAVIO und Mitarb., 1990). Die Erklärung für die Streuung des Ovulationszeitraumes ist in unterschiedlichen Stadien der Follikelreifungswellen zu suchen: Befinden sich die Tiere zum Zeitpunkt der Luteolyseinduktion in der Phase vor der Selektion des dominanten Follikels, so werden sie 2 bis 4 Tage benötigen, um einen dominanten Follikel zu bilden. Sie haben somit ein längeres und variables Intervall bis zum Einsetzen der Ovulation. Tiere mit einem intakten dominanten Follikel sind nach 2 bis 3 Tagen in Brunst, weil dieser dominante Follikel ovulieren wird (SAVIO und Mitarb., 1990; MIHM und Mitarb., 1996).

In der mit Decapeptyl® Depot behandelten Gruppe ovulierten 96 % der Jungrinder nach dem induzierten LH-Gipfel. Die Ergebnisse bezüglich des präovulatorischen LH-Gipfels und der Ovulationen stehen in Übereinstimmung mit den Aussagen anderer Autoren (MEE und Mitarb., 1993; HOTTA und Mitarb., 1995; GONG und Mitarb., 1995; 1996; BERGFELD und Mitarb., 1996a; D'OCCHIO und Mitarb., 1996 und RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Eines der mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere ovulierte nicht. Die Ursache für das Ausbleiben der Ovulation ist nicht bekannt. Möglicherweise könnte eine Störung der Follikelreifung vorgelegen haben, infolgedessen der Follikel zu wenig LH-Rezeptoren ausgebildet hat. Alle übrigen Versuchstiere ovulierten in einem verhältnismäßig engen Zeitraum nach Applikation von Decapeptyl® Depot, da der induzierte LH-Anstieg in zeitlicher Nähe zu dem erwartenden endogenen LH-Gipfel lag und gleichzeitig jeweils ein dominanter Follikel vorhanden war. In Übereinstimmung damit beschrieben TWAGIRAMUNGU et al. (1995a), dass die follikuläre Reaktion auf eine GnRH-Verabreichung vom Stadium der Follikelreifungswelle abhängig ist, in dem sich das Tier befindet: Ein intakter dominanter Follikel wird ovulieren, wenn eine angemessene Gonadotropinausschüttung induziert wird, während das Schicksal anderer Follikel möglicherweise vom Vorhandensein funktioneller LH-Rezeptoren auf den Granulosezellen bestimmt wird.

Die Ovulationen der mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere wurden 22 bis 46 Stunden nach dem LH-Gipfel festgestellt. Andere Autoren beobachteten die induzierten Ovulationen generell bereits am Tag 1 (AMBROSE und Mitarb., 1998). Dies begründet sich durch die unterschiedlich gewählten Zeiträume zwischen Induktion der Luteolyse und Applikation des GnRH-Agonisten (48 Stunden bei AMBROSE und Mitarb., 1998, 60 Stunden in der vorliegenden Studie).

Wie bereits beschrieben, wurde bei 20 % der Kontrolltiere die Ovulation erst zwischen dem 2. und 3. Tag post applicationem festgestellt. So war die Zeitspanne, in der es nach Eintritt der Luteolyse zu den Ovulationen bei den Kontrolltieren kam im Vergleich zu den behandelten Tieren einige Stunden länger. Eine Erklärung dafür ist das Ausbleiben der Synchronisation des präovulatorischen LH-Gipfels bei den Kontrolltieren. Eine solche Synchronisation tritt nur bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren auf.

Follikeldynamik - Anzahl der Follikelreifungswellen bei Kontroll- und Versuchstieren

Bei den in dieser Studie über die Zeitdauer eines vollständigen Interöstrusintervalles untersuchten Kontrolltieren wurden in zwei Fällen **zwei Follikelreifungswellen** beobachtet, ein Tier hatte drei Follikelreifungswellen. In anderen Untersuchungen wurden zwei bis drei, in einigen Fällen auch vier Wellen follikulärer Aktivität beschrieben (SIROIS und FORTUNE, 1988; SAVIO und Mitarb., 1988; GINTHER und Mitarb., 1989a). Andere Autoren unterstützen die Auffassung von einem zweiwelligen Verlauf der Follikelaktivität in der Mehrzahl der beobachteten Fälle (KNOPF und Mitarb., 1989; BADINGA und Mitarb., 1992). Der Beginn der Follikelreifungswellen der Kontrolltiere mit zwei Follikelreifungswellen konnte auf jeweils einen Tag vor der Ovulation (Tag 0 bzw. 1) und jeweils in Zyklusmitte (Tag 11 bzw. 13) festgelegt werden. Die erste Follikelreifungswelle begann demzufolge bei unbehandelten Tieren schon am Tag vor der Ovulation. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnissen von GINTHER und Mitarb. (1989a; 1989b; 1996a). KÄHN (1989) sowie KNOPF und Mitarb. (1989) beschreiben den Beginn der ersten Follikelreifungswelle erst mit bzw. nach erfolgter Ovulation.

Der **Beginn der zweiten Follikelreifungswelle erfolgte im Untersuchungszeitraum nach Erreichen des Maximaldurchmessers des ersten dominanten** (anovulatorischen) **Follikels**, in einer Zeit also, in welcher der erste dominante Follikel sich im Stadium der Stagnation befindet oder bereits zurückgebildet wird. Diese Ergebnisse bestätigen die Angaben von SIROIS und FORTUNE (1988), GINTHER und Mitarb. (1989a; 1989b) und KNOPF und Mitarb. (1989). Zu beachten sind bei der Auswertung jedoch erneut die unterschiedlichen Definitionen des Tages 0 durch die Autoren: Während SIROIS und FORTUNE (1988) den Tag der Brunst als Tag 0 definierten, legten GINTHER und Mitarb. (1989a, 1989b) und KNOPF und Mitarb. (1989) den Tag der Ovulation als Tag 0 fest. Dadurch kann es zwischen den Angaben verschiedener Autoren zu einer Differenz von etwa einem Tag kommen. Der ungestörte Ablauf des Zyklus der Kontrolltiere ist unter anderem an der am Tag 21 festgestellten Ovulation beim Tier 1/6 und am Vorhandensein eines präovulatorischen Follikels beim Tier 1/5 erkennbar.

Das Kontrolltier mit drei Follikelreifungswellen zeigte an den Tagen 0, 7 bis 11 und 19 erhöhte Follikelzahlen in den Kategorien Gesamtanzahl der Follikel und kleiner Follikel. In den genannten Zeiträumen konnte anhand der Ultraschalluntersuchungen jeweils der Beginn einer Follikelreifungswelle festgestellt werden. In anderen Studien wurde der Beginn der Follikelreifungswellen bei dreiwelligen Follikelwachstumsverlauf mit den Tagen 1, 10 bzw. 11 und 17 angegeben (GINTHER und Mitarb., 1989b; KNOPF und Mitarb., 1989), während SIROIS und FORTUNE (1988) und GONG und Mitarb. (1993) die Tage 2, 9 und 16 ermittelten. Die erste Follikelreifungswelle begann daher bei diesem Kontrolltier ebenfalls bereits am Tag vor der Ovulation. Der Beginn der zweiten Follikelreifungswelle ist in der vorliegenden Studie geringgradig eher, während die dritte Follikelreifungswelle etwas später zu beobachten war. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Es lässt sich jedoch vermuten, dass diese Verschiebung im Bereich der biologischen Spannweite liegt.

Das Follikelwachstumsverhalten der Versuchstiere kann in der Zeit der ersten Reifungswelle ebenfalls als wellenförmig bezeichnet werden. Als Beginn der ersten Follikelreifungswelle kann aufgrund der ultrasonographischen Untersuchung der Tag 1 angesehen werden.

Lediglich ein Tier zeigte bereits am Tag 0 den Beginn der Follikelreifungswelle. Die Ursachen hierfür sind nicht bekannt.

Es ist keine signifikante Differenz zwischen dem Maximaldurchmesser des dominanten Follikel der ersten Follikelreifungswelle und dessen Feststellungszeitpunkt im Vergleich zu den Kontrolltieren aufgetreten.

Im weiteren Untersuchungsverlauf war es bei den behandelten Tieren aufgrund der individuellen Follikelwachstumsverläufe nicht möglich, den Beginn einer zweiten Follikelreifungswelle eindeutig zu erkennen. Der jeweils nach dem DF 1 folgende große Follikel wird aus diesem Grunde in der weiteren Beschreibung als zweiter großer Follikel bezeichnet, um eine Differenzierung zum Begriff dominanter Follikel der zweiten Reifungswelle zu ermöglichen. Der zweite große Follikel erreichte unter dem Einfluss von Decapeptyl® Depot weder präovulatorische Größe noch Ovulationskompetenz. Sein Maximaldurchmesser liegt signifikant unter dem Maximaldurchmesser des dominanten Follikels der zweiten Follikelreifungswelle bei den Kontrolltieren. Es kam unter dem Einfluss von Decapeptyl® Depot in keinem Fall nach Ablauf der physiologischen Zykluslänge von 21 Tagen zu einer Ovulation.

Der maximale Durchmesser des größten Follikels der zweiten Follikelreifungswelle lag bei 70 % der untersuchten Tiere unter 9 mm. Die Ursache für das Ausbleiben der Entwicklung von reifen, präovulatorischen Follikeln könnte in der Unterdrückung der pulsatischen LH-Sekretion liegen, welche wiederum die Bildung von LH-Rezeptoren auf den Granulosazellen verhindert. Entsprechende Ergebnisse der Hemmung der Zyklusaktivität fanden auch andere Autoren bei Rindern unter dem chronischen Einfluss verschiedener GnRH-Agonisten (D'OCCHIO und Mitarb., 1996; GONG und Mitarb., 1996; AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Ebenso konnte bei Schafen eine Unterdrückung des Follikelwachstums unter dem Langzeiteinfluss eines GnRH-Agonisten festgestellt werden (MCNEILLY und FRASER, 1987; PICTON und MCNEILLY, 1991). Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen beschrieben BERGFELD und Mitarb. (1996a) neben der Beibehaltung des wellenförmigen Follikelwachstums eine signifikante Erhöhung der Wachstumsrate und der Maximaldurchmesser der Follikel der ersten Follikelreifungswelle bei präpubertalen Jungrindern unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten in Langzeitformulierung. In der zweiten und dritten Follikelreifungswelle waren die dominanten Follikel unter dem Einfluss des GnRH-Agonisten ebenfalls größer als die der Kontrolltiere (BERGFELD und Mitarb., 1996a). Andere Autoren beobachteten ebenfalls eine Stimulation des Follikelwachstums. Diese trat jedoch nach diskreten Injektionen von GnRH-Analoga, die nicht in Langzeitformulierung vorlagen, auf (MACMILLAN und THATCHER, 1991; THATCHER und Mitarb., 1993). Eine anfängliche, dosis- und wirkstoffabhängige Stimulation des Follikelwachstums wurde zum Teil auch nach chronischer Applikation von GnRH-Agonisten beschrieben, jedoch folgte dieser Stimulation eine Hemmung der Zyklusaktivität (RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). In der vorliegenden Studie konnte ein solcher Zusammenhang nicht festgestellt werden.

Follikeldynamik - Anzahl der Follikel in den einzelnen Größenklassen bei Kontrolltieren mit zwei Follikelreifungswellen und Versuchstieren

Für den direkten Vergleich der Follikelzahlen in den einzelnen Größenklassen konnten die Daten von sieben Tieren (5V; 2K) genutzt werden. Eine statistische Bearbeitung der Daten mittels Varianzanalyse unter der Annahme gleicher Restvarianzen in beiden Gruppen erlaubt dennoch einen Vergleich der Follikelzahlen zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren.

Die Auswertung der Anzahl der an der ersten Follikelreifungswelle beteiligten Follikel (Tag 0 bzw. 1) ergab keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren mit zweiwelligem Follikelwachstum und den Versuchstieren. Die Ergebnisse der statistischen Analyse der Follikelzahlen in den einzelnen Kategorien zeigen jedoch eine deutliche Erhöhung der Gesamtfollikelanzahl am Tag 2 nach Applikation des GnRH-Agonisten. Diese Gesamterhöhung hat ihre Ursache in der signifikanten Erhöhung der Anzahl kleiner Follikel am Tag 2. Darüber hinaus ist bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren die Anzahl kleiner Follikel auch an den Tagen 5 und 19 signifikant höher als bei den unbehandelten Tieren. Die Behandlung mit dem langzeitaktiven GnRH-Agonisten bewirkte demzufolge eine Erhöhung der Zahl kleiner Follikel über einen längeren Zeitraum. Die aus den eigenen Experimenten resultierenden Angaben zur Anzahl kleiner Follikel bedürfen aufgrund des Stichprobenumfanges jedoch einer weiteren Verifizierung.

Im weiteren Zyklusverlauf widerspiegelt das Verhalten der mittleren und großen Follikel die Tatsache, dass ein physiologischer Ablauf der Follikelreifungswellen offenbar nur bei den Kontrolltieren stattfindet. Die Tatsache, dass in der Kategorie der Follikel mit einem Durchmesser von 4 bis 8 mm am Tag 15 bei den Kontrolltieren signifikant mehr Follikel vorhanden waren als bei den behandelten Tieren, lässt vermuten, dass unter dem Einfluss des Decapeptyl® Depot die Entwicklung zu mittelgroßen Follikeln eingeschränkt wird. Dies gilt offenbar auch für die Entwicklung von großen Follikeln. Signifikant mehr Follikel dieser Größenklasse waren bei den Kontrolltieren an den Tagen 2, 7 und 21 vorhanden. Am Tag 21 war dagegen bei keinem der fünf Versuchstiere ein Follikel über 8 mm vorhanden. Eine Hemmung der zyklischen Ovaritätigkeit wurde auch in anderen Studien für das Rind und das Schaf beschrieben (MCNEILLY und FRASER, 1987; PICTON und MCNEILLY, 1991; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; GONG und Mitarb., 1996; AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Im Gegensatz zu anderen Studien (GONG und Mitarb., 1995; GONG und Mitarb., 1996; AMBROSE und Mitarb., 1998) gibt die vorliegende Studie jedoch Anhaltspunkte dafür, dass die Störung des dynamischen Follikel-Turnover unter dem Einfluss eines langzeitaktiven GnRH-Agonisten bereits in der zweiten Follikelreifungswelle beim Übergang von Follikeln kleiner zu mittlerer Größe einsetzt.

Die in der vorliegenden Studie zu beobachtenden Follikelzahlen stimmen im wesentlichen mit denen aus anderen Studien überein (PIERSON und GINTHER, 1987a; GINTHER und Mitarb., 1996a). Mitunter sind in dieser Arbeit geringgradig höhere Follikelzahlen ermittelt worden. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der Zuordnung aller wahrnehmbarer Follikel mit einer Größe von 1 bis 4 mm zur Kategorie kleine Follikel. Aus der Literatur sind jedoch nur Studien bekannt, in denen die ultrasonographische Erfassung von Follikeln ab einer Größe von 2 mm beschrieben wurde (PIERSON und GINTHER, 1987a,b; AMBROSE und Mitarb., 1998). Es muss darauf hingewiesen werden, dass auch mit der Technik der transrektalen Ultrasonographie nur Follikel ab einer Größe von 4 mm von Tag zu Tag verfolgt werden können.

Obwohl kleinere Follikel gesehen werden können, ist es nicht möglich, ihr individuelles Wachstum exakt zu verfolgen (FORTUNE und Mitarb., 1988). Wenn Follikel der Größe 3 bis 5 mm individuell untersucht werden sollen, sind mehrere Ultraschalluntersuchungen pro Tag nötig (GINTHER und Mitarb., 1997).

Da jedoch in der vorliegenden Untersuchung bei der Auswertung der Follikelzahlen der einzelnen Größenklassen die individuelle Identifizierung jedes einzelnen Follikels nicht erforderlich war, können auch die wahrnehmbaren Follikel unter 2 mm in die Ergebnisse einbezogen werden.

In der vorliegenden Untersuchung konnte bei den Kontrolltieren mit zwei Follikelreifungswellen ein wellenförmiges (bimodales) Verhalten der Gesamtfollikelanzahl, der kleinen und der mittleren Follikel festgestellt werden. Vergleichbare Ergebnisse, jedoch bei etwas anderer Einteilung der Follikel in bestimmte Größenkategorien wurden von PIERSON und GINTHER (1987a) beschrieben. Bei den Kontrolltieren ist in der vorliegenden Untersuchung über den gesamten Zyklusverlauf jeweils mindestens ein Follikel mit einem Durchmesser über 8 mm beobachtet worden. Ein bimodales Verhalten der Follikelanzahl großer Follikel war in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu einer anderen Studie (PIERSON und GINTHER, 1987a) nicht erkennbar. Eine Erklärung dafür ist einerseits in der physiologischerweise geringen Anzahl von Follikeln dieser Größenklasse zu suchen, andererseits spielt auch die festgelegte Follikelgrößenklasse eine Rolle. Andere Ergebnisse könnten eventuell durch eine veränderte Größenkategorie-Einteilung (z.B. in Follikel mit einem Durchmesser von 7 bis 10 mm und von 11 bis 14 mm) erzielt werden.

Bei den Kontrolltieren mit zwei Follikelreifungswellen konnte, ebenso wie in einer anderen Untersuchung (LUCY und Mitarb., 1992), während des gesamten Zyklus eine inverse Beziehung zwischen der Anzahl kleiner Follikel und der Anzahl mittelgroßer Follikel festgestellt werden. Dieses Verhalten lässt sich unter anderem durch das Wachstum der Follikel von kleiner zu mittlerer Größe erklären. Die Ausbildung eines dominanten Follikels hemmt die weitere Entwicklung der mittelgroßen Follikel, deshalb sinkt ihre Zahl wieder. Nach dem Verlust der Dominanz (bzw. nach der Ovulation) steigt die Zahl kleiner Follikel erneut an. Abbildung 11 verdeutlicht die inverse Beziehung der Zahl kleiner und mittlerer Follikel im Verlauf des Zyklus. Unter dem Einfluss des Decapeptyl® Depot sind diese inversen Verhältnisse nicht mehr zu beobachten. Daraus kann geschlossen werden, dass der GnRH-Agonist in Langzeitformulierung die Rekrutierung mittelgroßer Follikel aus dem Pool der kleinen Follikel unterbindet. Die Hemmung des dynamischen Turnover mittlerer und großer Follikel wurde auch von AMBROSE und Mitarb. (1998) beschrieben.

LH-Sekretion

Bei den **Kontrolltieren** wurde an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 eine **reguläre pulsatile Sekretion von LH** festgestellt (Abbildungen 13 und 14, Tabelle A5). Mit 2,2 Pulsen pro 6 Stunden war eine bemerkenswert geringe Pulsfrequenz am Tag 1 zu beobachten. Die Ursache für diese geringe Pulsfrequenz im Zeitraum unmittelbar nach der Ovulation ist in der homologen Down-Regulation der GnRH-Rezeptoren nach dem GnRH-stimulierten, endogenen LH-Gipfel zu suchen (WEISS und Mitarb., 1995). Andere Autoren fanden keine Pulsatilität der LH-Sekretion für 6 bis 12 Stunden nach dem LH-Gipfel (WALTERS und SCHALLENBERGER, 1984; MEE und Mitarb., 1993).

In der frühen Lutealphase waren bei den Kontrolltieren mehr LH-Pulse als in der mittleren Lutealphase zu finden. Gleichzeitig hatten die LH-Pulse der Kontrolltiere in der frühen Lutealphase geringere Amplituden als in der mittleren Lutealphase. Beides wird auch durch Ergebnisse aus anderen Studien bestätigt (WALTERS und Mitarb., 1984; SCHALLENBERGER, 1990).

Die Ergebnisse an den Tagen 2 bis 5 aus der vorliegenden Untersuchung lagen zwischen 3,0 und 4,6 Pulsen/6 Stunden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Autoren (RAHE und Mitarb., 1980; WALTERS und Mitarb., 1984; SCHALLENBERGER, 1990; PETERS und Mitarb., 1994; RHODES und Mitarb., 1995; GINTHER und Mitarb., 1998). In der Studie von MEE und Mitarb. (1993) wurden jedoch geringere Pulszahlen angegeben (1,4 Pulse/6 Stunden).

Die Ergebnisse an den Tagen 11 und 15 aus der vorliegenden Untersuchung liegen mit 3,3 und 3,7 Pulsen pro 6 Stunden etwas unter den Werten aus der frühen Lutealphase. Sie sind jedoch höher als die Ergebnisse von RAHE und Mitarb. (1980), SCHALLENBERGER (1990), CUPP und Mitarb. (1995), PETERS und Mitarb. (1994), RHODES und Mitarb. (1995) sowie MIHM und Mitarb. (1996). Die Ursachen für die Unterschiede der Werte für die Lutealphase in den verschiedenen Publikationen könnten neben den Blutentnahme-Abständen in den unterschiedlichen Methoden liegen, mit denen die Pulse definiert und identifiziert wurden. Allerdings treffen beide Aspekte auch auf die Ergebnisse aus der frühen Lutealphase zu, in der die Resultate mit den in der Literatur zu findenden Ergebnissen übereinstimmen.

Die mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere hatten an allen Tagen signifikant weniger LH-Pulse pro Zeiteinheit als die Kontrolltiere. Eine Verringerung der LH-Pulsfrequenz unter dem Einfluss von GnRH-Agonisten konnte auch bei männlichen Rindern, präpubertalen Jungrindern und gegen GnRH immunisierten Jungrindern nachgewiesen werden (GRASSELLI und Mitarb., 1993; RONAYNE und Mitarb., 1993; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; PRENDIVILLE und Mitarb., 1996). Die Ursache dafür besteht in der Rezeptor-Downregulation infolge chronischer Einwirkung der GnRH-Agonisten (CONN und CROWLEY, 1991; KIESEL und RUNNEBAUM, 1992; GONG und Mitarb., 1995; GONG und Mitarb., 1996; ASPDEN und Mitarb., 1996; BERGFELD und Mitarb., 1996a).

In den vorliegenden Untersuchungen waren die basalen LH-Konzentrationen der mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen vom ersten Tag post applicationem an auf einem höheren Niveau. Signifikant höhere LH-Basalkonzentrationen bestanden bei den Versuchstieren an den Tagen 1 bis 3 im Vergleich zu den Kontrolltieren. Danach fielen die Werte bis zum Tag 11 auf ein Niveau, auf dem sie auch am Tag 15 festgestellt wurden. An den Tagen 4 und 5, 11 sowie 15 bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchstieren.

Eine Erhöhung des LH-Basalniveaus über einige Tage nach Applikation eines GnRH-Agonisten wurde auch von anderen Autoren beschrieben (EVANS und RAWLINGS, 1994; GONG und Mitarb., 1995; GONG und Mitarb., 1996; BERGFELD und Mitarb., 1996a,b; D'OCCHIO und Mitarb., 1996; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Diese Ergebnisse sind, wie auch der initiale LH-Gipfel nach Applikation des Decapeptyl® Depot, der anfänglichen, kurzfristigen Verstärkung der hypophysären Gonadotropinausschüttung zuzuordnen (KIESEL und RUNNEBAUM, 1992).

Einige Autoren beschreiben, dass im Anschluss an die Phase der initialen Erhöhung der basalen LH-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle unveränderte (BERGFELD und Mitarb., 1996a) oder erhöhte (GONG und Mitarb., 1995) LH-Basalkonzentrationen auftraten. Bei kastrierten männlichen Rindern kam es unter dem Langzeit-Einfluss eines GnRH-Agonisten (10,7 mg Deslorelin über 42 Tage) zu einer signifikanten Senkung des basalen LH-Niveaus (ASPDEN und Mitarb., 1996). In den vorliegenden Experimenten wurde keine Verringerung der LH-Basalkonzentration festgestellt. Als Ursache dafür kann die Dauer der Untersuchungen in Betracht gezogen werden. Bei längerwährender Untersuchungsdauer ist eine Senkung des LH-Basalniveaus infolge der Down-Regulation hypophysärer GnRH-Rezeptoren zu erwarten. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass bei der Unterdrückung der basalen Gonadotropinausschüttung der Zeitpunkt und die Stärke der Wirkungsausprägung vom angewendeten Wirkstoff und dessen Dosis bestimmt werden.

Die dargestellten Ergebnisse aus der Literatur zeigen in Verbindung mit den Resultaten aus der vorliegenden Untersuchung, dass der Einfluss des GnRH-Agonisten auf die LH-Sekretion unterschiedlich sein kann. Er ist abhängig von der Art der Applikation (wiederholte Injektionen, Minipumpen oder Depotformulierungen), der Behandlungsdauer sowie Art und Dosis der applizierten Substanz. Desweiteren spielt die Existenz der gonadalen Rückkopplungs-Mechanismen eine wichtige Rolle in der Regulation der basalen Konzentration, wie die verhältnismäßig schnelle Senkung des LH-Basalniveaus unter dem chronischen Einfluss eines GnRH-Agonisten beim Ochsen zeigte.

FSH-Sekretion

Periphere Messungen von Hormonkonzentrationen sind in erheblichem Maße abhängig von der Sekretionsrate, der Clearance (Ausscheidung) und der Degradation (Abbau) des gemessenen Hormones. Die Sekretionsdynamik von FSH ist aufgrund der relativ langen Halbwertszeit (HWZ) (PADMANABHAN und Mitarb., 1997) und der molekularen Heterogenität (ULLOA-AGUIRRE und Mitarb., 1995; COOKE und Mitarb., 1996) schwierig zu untersuchen. Zudem scheinen die in den Pulsen sezernierten Isoformen eine wesentlich kürzere HWZ zu haben als die zwischen den Pulsen freigesetzten (PADMANABHAN und Mitarb., 1997). Deshalb können anhand peripherer Hormonkonzentrationen nur vorsichtige Schlüsse über den Sekretionsmodus gezogen werden.

Zeitgleich mit einem hohen endogenen LH-Gipfel (> 10 ng/ml) kann nach den Angaben von WALTERS und SCHALLENBERGER (1984) ein FSH-Anstieg beobachtet werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde bei den Kontrolltieren zum Zeitpunkt des spontanen LH-Gipfels keine Erhöhung des FSH-Basalniveaus festgestellt. Die Ursache dafür liegt vermutlich darin, dass die FSH-Erhöhungen außerhalb der Blutentnahmezeiten stattfanden.

Für diese Vermutung spricht, dass keiner der spontanen LH-Gipfel innerhalb der Zeiten der frequenten Blutentnahme vollständig erfasst werden konnte. Von WALTERS und SCHALLENBERGER (1984) wurde ein zweiter FSH-Anstieg beschrieben, der 4 bis 12 Stunden nach dem LH-Gipfel begann und ein Resultat erhöhter FSH-Pulsamplituden war. Dieser zweite FSH-Anstieg wurde in den eigenen Untersuchungen nicht beobachtet. Der Grund dafür könnte in den unterschiedlichen Zeiten der Blutentnahme liegen.

Die Applikation des GnRH-Agonisten in Depotformulierung bewirkte eine schnelle initiale FSH-Ausschüttung. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus anderen Arbeiten (GONG und Mitarb., 1995; GONG und Mitarb., 1996). Im Unterschied zu den anderen Studien (Erhöhung: GONG und Mitarb., 1995; Verringerung: ASPDEN und Mitarb., 1996, bei Ochsen) konnten nach der initialen FSH-Erhöhung keine signifikanten Differenzen zwischen den basalen FSH-Konzentrationen der Kontroll- und Versuchstiere beobachtet werden. Jedoch kann bei einer längeren Wirkungsdauer bzw. einer höheren Dosis des verabreichten GnRH-Agonisten aufgrund der Down-Regulation der gonadotropen Hypophysenfunktion eine Senkung der basalen FSH-Konzentration erwartet werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei den Kontrolltieren zu allen Zeitpunkten der frequenten Blutentnahme (Tag 0 bis 5, 11 und 15) eine pulsatile FSH-Sekretion festgestellt. Die Pulsanzahl lag zwischen 2 und 5 Pulsen pro 6 Stunden (Abbildung 17, Tabelle A9). Dabei wurden an den Tagen 0 bis 3 mit 3 bis 5 Pulsen pro 6 Stunden tendenziell mehr Pulse gefunden als an den Tagen 4 und 5 sowie 11 und 15, an denen die FSH-Pulsanzahl zwischen 2 und 3 Pulsen pro 6 Stunden lag. Dies bestätigt Ergebnisse anderer Autoren, die eine signifikante Reduktion der Pulsanzahl in der mittleren Lutealphase gegenüber der frühen Lutealphase beschreiben (WALTERS und Mitarb., 1984). Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von WALTERS und Mitarb., (1984) wurden bei den Kontrolltieren keine Unterschiede bezüglich der FSH-Pulsamplitude und der FSH-Basalkonzentration in der frühen und mittleren Lutealphase festgestellt (Abbildungen 18 und 20; Tabellen A10, A12). Die mit Decapeptyl® Depot behandelten Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren am Tag der Applikation des GnRH-Agonisten (Tag 0) eine signifikante Reduktion der FSH-Pulszahl auf. **An den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der FSH-Pulszahl und des FSH-Basalniveaus zwischen den Kontroll- und Versuchstieren.** Am Tag 4 trat bei den Versuchstieren eine signifikant geringere FSH-Pulsamplitude als bei den Kontrolltieren auf. Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Bei diesem Ergebnis ist jedoch zu beachten, dass die Zahl der für die FSH-Auswertung zur Verfügung stehenden Tiere am Tag 4 am geringsten war.

Im Gegensatz zu WALTERS und Mitarb. (1984) wurde in der vorliegenden Untersuchung das gemeinsame Auftreten von LH- und FSH-Pulsen in der frühen Lutealphase nicht beobachtet. In der mittleren Lutealphase traten in genannten Studie 41 % mehr FSH- als LH-Pulse auf. In der eigenen Arbeit wurden in der mittleren Lutealphase weniger FSH- als LH-Pulse gefunden. Dieses im Widerspruch zu den Untersuchungen von WALTERS und Mitarb. (1984) stehende Ergebnis kann aktuell nicht erklärt werden. Es können verschiedene Assay-Kriterien (Kreuzreaktivität mit LH) an der Ausprägung der beobachteten Unterschieden beteiligt sein (RHODES und Mitarb., 1995).

Am Tag 0 trat bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung des basalen FSH-Niveaus auf. An den Tagen 4 und 5 zeigte sich bei den Kontrolltieren eine geringgradige Verringerung des basalen FSH-Niveaus. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von EVANS und Mitarb. (1997). Der Abfall der basalen FSH-Konzentration wird nach SALFEN und Mitarb. (1999) durch das vom dominanten Follikel gebildete E₂ über einen negativen Feedback-Mechanismus verursacht. Auch bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren trat an den Tagen 4 und 5 eine nicht signifikante Verringerung des FSH-Basalniveaus auf. Dies wird aufgrund der unbeeinflussten ersten Follikelreifungswelle unter dem Einfluss des GnRH-Agonisten gleichfalls als das Resultat des negativen Feedback-Mechanismus der follikulären Steroidbildung angesehen.

Unterschiede in der Regulation der Gonadotropine FSH und LH

Neben den Mechanismen des gonadalen Feedback und der unterschiedlichen Beeinflussung der Gonadotropine FSH und LH durch unterschiedliche GnRH-Pulsfrequenzen (BESECKE und Mitarb., 1996) scheint noch ein weiterer regulatorischer Mechanismus, der in die differenzierte Regulation der Gonadotropine integriert ist, zu existieren. Anhaltspunkt dafür ist die Tatsache, dass in den vorliegenden Untersuchungen ein kontinuierlicher GnRH-Einfluss eine differenzierte Reaktionen auf der Ebene der FSH- und LH-Sekretion bewirkte. Die Untersuchungen an Pfortaderblut der Hypophyse bei Schafen ergab, dass die pulsatile Sekretion des GnRH mit der Pulsatilität der LH-Ausschüttung einherging (MOENTER und Mitarb., 1992). Demgegenüber war ein Anstieg der FSH-Konzentrationen bei Jungrindern nicht immer mit einer LH-Erhöhung verbunden (SUNDERLAND und Mitarb., 1994). Beim Menschen wurde nach dreiwöchiger Applikation eines GnRH-Agonisten eine Reduzierung der LH-Pulsatilität beobachtet, die FSH-Freisetzung erfolgte jedoch weiterhin pulsatil (GENAZZANI und Mitarb., 1996).

Aus den genannten Beobachtungen und aus den eigenen Ergebnissen, lässt sich in Übereinstimmung mit GENAZZANI und Mitarb. (1996) die Existenz anderer, das FSH-Sekretionsverhalten beeinflussender Substanzen ableiten. Es ist bereits als belegt anzusehen, dass Estradiol (PRICE und WEBB, 1988) und Inhibin (BEARD und Mitarb., 1990; RIVIER und VALE, 1991; ROBERTSON und Mitarb., 1991) die FSH-Freisetzung in negativer Hinsicht beeinflussen können. Jedoch sind die exakten Mechanismen noch ungeklärt.

Progesteron

Die in dieser Studie gefundenen Progesteronkonzentrationen in der Vena cava caudalis lagen über den Konzentrationen in der Vena jugularis. Dies stimmt sowohl mit den in der Literatur angegebenen Verhältnissen (WALTERS und SCHALLENBERGER, 1984; SCHALLENBERGER, 1990), als auch mit den in den eigenen Vorversuchen gefundenen Ergebnissen überein.

Bei den Kontrolltieren wurden die für einen physiologisch ablaufenden Zyklus typischen Progesteronkonzentrationen gemessen. Nach der Ovulation, welche bei 80 % der Kontrolltiere bis zum Tag 2 erfolgte, war ein kontinuierlicher Progesteronanstieg bis zum Tag 11 zu beobachten. Die maximalen Konzentrationen wurden, beginnend vom Tag 11, über 5 Tage gehalten. Am Tag 16 begannen die Progesteronkonzentrationen zu fallen. Am Tag 21 waren die basalen Ausgangskonzentrationen erreicht.

Der bei den Versuchstieren beobachtete raschere Anstieg, der Trend zu erhöhten Progesteronkonzentration ab dem Tag 6, sowie die signifikant höheren Konzentrationen an den Tagen 17 bis 19 ist auf die Wirkung des GnRH-Agonisten zurückzuführen. Erhöhte Progesteronkonzentrationen unter dem Einfluss von GnRH-Agonisten wurden auch in anderen Studien beschrieben (MEE und Mitarb., 1993; GONG und Mitarb., 1995; HOTTA und Mitarb., 1995; BERGFELD und Mitarb., 1996a und D'OCCHIO und Mitarb., 1996, AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Da eine Beteiligung zusätzlich induzierter Corpora lutea an der Progesteronsynthese in der vorliegenden Untersuchung ausgeschlossen werden kann, muss die Ursache des erhöhten Progesteronniveaus in der Beeinflussung des vorhandenen (induzierten) Gelbkörpers zu suchen sein.

Im Gelbkörperparenchym existieren mindestens zwei unterschiedliche, progesteronproduzierende Zelltypen. Diese Zellen werden aufgrund ihrer Morphologie in kleine und große Luteinzellen unterteilt. Die großen Luteinzellen sezernieren etwa zwanzigmal mehr Progesteron als die kleinen Luteinzellen (FITZ und Mitarb., 1982). Die kleinen Luteinzellen besitzen wiederum - *im Gegensatz zu den großen Luteinzellen* – zahlreiche LH-Rezeptoren und zeigen *in vitro* eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der Stimulation mit LH (FITZ und Mitarb., 1982; NISWENDER und Mitarb., 1985). Im Verlauf der Lutealphase ändert sich das Verhältnis von kleinen zu großen Luteinzellen zugunsten der großen Luteinzellen, die durch Differenzierung aus den kleinen Luteinzellen hervorgehen (FITZ und Mitarb., 1982; ALILA und HANSEL, 1984). Demzufolge produzieren die großen Luteinzellen über einen LH-unabhängigen Mechanismus den überwiegenden Anteil (über 80 %) des basalen Progesteronniveaus (NISWENDER und Mitarb., 1985; 1994).

Die Applikation von Decapeptyl® Depot hat eventuell infolge der induzierten LH-Ausschüttung und des erhöhten LH-Basalniveaus die Differenzierung kleiner Luteinzellen gefördert, in deren Folge mehr große Luteinzellen entstehen, die den Hauptanteil des Progesterons produzieren. Anhaltspunkte dafür gibt es auch bei anderen Autoren (DONALDSON und HANSEL, 1965; NISWENDER und Mitarb., 1985 MEE und Mitarb., 1993; AMBROSE und Mitarb., 1998). TWAGIRAMUNGU und Mitarb. (1995b) fanden eine höhere Anzahl an großen Luteinzellen bei gleichzeitig erhöhten Gelbkörpermassen unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten. Allerdings waren diese Veränderungen nicht mit einem erhöhten Progesteronniveau bei zyklischen Rindern bis zum Tag 6 verbunden. Wenn eine erhöhte LH-Basalkonzentration kurze Zeit post ovulationem als Stimulus für die Differenzierung der Luteinzellen fungiert und im Ergebnis mehr große,

progesteronproduzierende Luteinzellen vorliegen, müsste das Verhältnis kleiner zu großen Luteinzellen zugunsten der großen Luteinzellen verschoben sein. Eine Bestimmung dieses Verhältnisses bezogen auf die Gelbkörpermasse zu unterschiedlichen Zeitpunkten über die gesamte Zykluslänge bei behandelten und unbehandelten Tieren kann neue Anhaltspunkte zur Prüfung der genannten Hypothese liefern. Aufgrund der Tatsache, dass auf den großen Luteinzellen keine GnRH-Rezeptoren nachgewiesen wurden (BROWN und REEVES, 1983; IRELAND und Mitarb., 1990), ist es unwahrscheinlich, dass der GnRH-Agonist direkt einen Einfluss auf den Gelbkörper ausübt (TWAGIRAMUNGU und Mitarb., 1995b). Jedoch war nach LH- oder hCG-Administration eine Erhöhung der Anzahl großer Luteinzellen bei gleichzeitiger Verringerung der Anzahl kleiner Luteinzellen zu beobachten (NISWENDER und Mitarb., 1985; FARIN und Mitarb., 1988). Diese Tatsache liefert den Hinweis dafür, dass die Wirkung des GnRH-Agonisten auf den Gelbkörper indirekt, über die Stimulation der Gonadotropinsekretion, vermittelt wird.

In anderen Studien wurde eine geringe oder keine Korrelation zwischen den episodisch auftretenden LH-Pulsen und der Progesteronkonzentration in der Lutealphase des Schafes beschrieben. (BAIRD und Mitarb., 1976; MC NEILLY und Mitarb., 1992). Beim Rind soll die Stimulation durch LH-Pulse für die normale Funktion des Corpus luteum vom Tag 2 bis 12 nötig sein, jedoch an den Tagen 12 bis 17 keinen Einfluss mehr ausüben (PETERS und Mitarb., 1993; 1994). Darüber hinaus wurde in einer Studie nach Applikation eines GnRH-Antagonisten eine Verringerung des Progesteronniveaus bei gleichzeitiger Reduktion der LH-Pulsanzahl und des LH-Basalniveaus beobachtet (PETERS und Mitarb., 1994). Analog dazu kam es in der vorliegenden Studie bei Erhöhung des LH-Basalniveaus (und gleichzeitiger Reduktion der LH-Pulsanzahl) zu einer Erhöhung der Progesteronkonzentration. Daher kann angenommen werden, dass nicht die Pulsatilität, sondern der induzierte präovulatorische LH-Gipfel und das erhöhte LH-Basalniveau unmittelbar nach der Ovulation als indirekter Stimulus der Progesteronsekretion wirkt. Hinweise dafür können auch aus Studien gewonnen werden, in denen ein GnRH-Antagonist zum Einsatz kam: DOBSON und Mitarb. (1997) nutzten beim Schaf einen GnRH-Antagonisten und verschoben damit den Zeitpunkt des LH-Gipfels. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sprechen dafür, dass ein erhöhtes LH-Basalniveau ein auslösender Faktor für die erhöhte Progesteronproduktion sein könnte. Im Gegensatz dazu sollen beim Menschen die LH-Pulse in der Lutealphase der hauptsächliche luteotrope Stimulus sein. Anhaltspunkt dafür ist das höhere Progesteronniveau, welches beim Auftreten vieler LH-Pulse ausgebildet wird (ROSSMANITH und Mitarb., 1990). BERGFELD und Mitarb. (1996c) beschrieben, dass beim Rind die Erniedrigung der systemischen Progesteronkonzentration innerhalb von 6 Stunden zu einer Erhöhung der LH-Pulsanzahl und der Estradiolkonzentrationen geführt hat. Andere Autoren fanden bei geringen Progesteronkonzentrationen ebenfalls eine Erhöhung der LH-Pulsfrequenz (ROCHE und IRELAND, 1981; IRELAND und ROCHE, 1982a, CUPP und Mitarb., 1995) und des LH-Basalniveaus (INSKEEP und Mitarb., 1996). Diese Veränderungen fanden jedoch nur am Ende der Lutealphase im Übergang zur follikulären Phase des Zyklus statt.

Neben der Stimulation der Bildung großer Luteinzellen könnte LH auch beide Typen von Luteinzellen zur Progesteronbildung und -sekretion anregen. Da große Luteinzellen jedoch im Gegensatz zu den kleinen Luteinzellen keine LH-Rezeptoren besitzen, kann es sich hierbei wiederum nur um eine indirekte Beeinflussung handeln. Für kleine Luteinzellen vom Schaf

konnte jedoch gezeigt werden, dass die Stimulation mit LH die Progesteronfreisetzung erhöhte (FITZ und Mitarb., 1982).

Bezogen auf die vorliegende Untersuchung bedeutet dies, dass ein Teil des zusätzlich gebildeten Progesterons auch aufgrund der direkten Stimulation der kleinen Luteinzellen produziert worden sein kann.

Die genannten Ergebnisse implizieren, dass der intensivere und höhere Progesteronanstieg nach Applikation eines GnRH-Agonisten in Depotformulierung seine Ursache im erhöhten Niveau des zirkulierenden LH hat. Der Einfluss des FSH auf den Gelbkörper ist noch weitgehend ungeklärt. Angesichts der Tatsache, dass FSH-Rezeptoren auf bovinen Luteinzellen gefunden wurden (MANNS und Mitarb., 1984), kann ein solcher Einfluss nicht vollständig ausgeschlossen werden. In einer Studie konnte nach einmaliger Applikation eines GnRH-Agonisten in der Brunst neben einem erhöhten Progesteronniveau eine Steigerung der FSH-Pulsanzahl und der durchschnittlichen FSH-Konzentration am Tag 8 nach Applikation beobachtet werden (MEE und Mitarb., 1993). In der genannten Studie war jedoch die LH-Pulsanzahl unbeeinflusst und die durchschnittliche LH-Konzentration war nach GnRH-Applikation im Vergleich zu den Kontrolltieren verringert. Daraus zogen MEE und Mitarb. (1993) den Schluss, dass FSH beim Rind eine luteotrope und progesteronsteigernde Wirkung ausüben kann, wenn die LH-Sekretion vermindert ist. Wenngleich in den vorliegenden Untersuchungen mit Ausnahme des Tages 0 keine Beeinflussung der FSH-Sekretion festgestellt wurde, ist dennoch ungeklärt, ob die initiale FSH-Erhöhung unmittelbar nach Applikation des GnRH-Agonisten ursächlich an der Erhöhung der Progesteronsekretion des Corpus luteum beteiligt war.

Im Verlauf der Plateauphase trat bei den mit dem GnRH-Agonisten behandelten Tieren zu keinem Zeitpunkt eine geringere Progesteronkonzentration auf als bei den Kontrolltieren. Es ist eine Tendenz zu höheren Progesteronkonzentrationen unter dem Einfluss des Decapeptyl[®] Depot erkennbar. Der signifikante Progesteronabfall am Ende der Untersuchungsperiode erfolgt bei den Versuchstieren später als bei den Kontrolltieren. Eventuell ist dies auf das Fehlen des luteolytischen Stimulus infolge des Fehlens eines estrogenaktiven präovulatorischen Follikels bei den Versuchstieren zurückzuführen (SILVIA und Mitarb., 1991; MANN und LAMMING, 1995b). Auch MACMILLAN und Mitarb., (1991) beschrieben eine verzögerte Luteolyse nach der Applikation des GnRH-Agonisten Buserelin. Im Gegensatz dazu unterstützt eine andere Studie (MANN und Mitarb., 1998) die Beobachtung, dass die Beschleunigung des postovulatorischen Progesteronanstieges durch Applikation von Progesteron mit einer äquivalenten Beschleunigung des Einsetzens des luteolytischen Signals verbunden ist. Jedoch kontrolliert die postovulatorische Progesteronentwicklung die Luteolyseterminierung nicht ultimativ, sondern offenbar unterstützt Progesteron lediglich den Prozess der Luteolyseterminierung. Bei einem späteren Progesteronanstieg kam es nicht zu einer Verzögerung des Luteolyseeintrittes, woraus geschlussfolgert werden kann, dass der Faktor, der die Luteolyseterminierung kontrolliert, unabhängig von der Progesteronkontrolle wirkt.

Beim Rind erfolgt die Luteolyse infolge des vom Endometrium freigesetzten Prostaglandins (PG) $F_{2\alpha}$ (WATHES und LAMMING, 1995). Das Progesteron kontrolliert dabei sowohl die Freisetzung des $PGF_{2\alpha}$ als auch die Bildung der Oxytozin-Rezeptoren. Es verhindert in der Lutealphase die Bildung von Oxytozin-Rezeptoren im Endometrium. Es könnte sein, dass ein

Oxytozin-Rezeptor-Hemmer während der Lutealphase gebildet wird (WATHES und LAMMING, 1995).

Ein frühzeitiger Progesteronanstieg in der Lutealphase scheint zum Verlust dieser Hemmung der Oxytozin-Rezeptoren beizutragen, wodurch ein früherer Luteolyssebeginn zu erklären wäre. Jedoch liefert dieses Modell keine Erklärung für eine Verzögerung der Luteolyse, wie sie in der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte.

Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine höhere Progesteronkonzentration in der Lutealphase die Ausbildung eines geringeren luteolytischen Signals bewirkt als eine niedrige Progesteronkonzentration (MANN und LAMMING, 1995b). Darüber hinaus zeigten Tiere mit einem höheren Progesteronniveau erst später Reaktionen auf einen luteolytischen Stimulus als Tiere mit einer geringeren Progesteronkonzentration. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der vorliegenden Studie überein. Darüber hinaus ist zu vermuten, dass die Steroide Progesteron und Estradiol ursächlich an der Vermittlung dieses Effektes beteiligt sind. Die Mitwirkung anderer ovarieller Substanzen ist insofern auszuschließen, als in der Untersuchung von MANN und LAMMING (1995b) ovariectomisierte Rinder zum Einsatz kamen, bei denen die Lutealphasen-Bedingungen durch Injektionen von Progesteron und Estradiol simuliert wurden. MANN und LAMMING (1995b) erwähnten desweiteren, dass die Injektion von Buserelin zu einer Verminderung der PGF_{2α}-Produktion führt. Auch dieses Ergebnis ist mit der Tatsache eines verzögerten Eintrittes der Luteolyse, wie sie in der vorliegenden Studie unter dem Einfluss des Decapeptyl® Depot beobachtet wurde, vereinbar.

Bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren wurde bezüglich des Verlaufes der Progesteronkurve ein steilerer Anstieg, ein höheres Maximum und ein verzögerter Beginn des Abfalls festgestellt. Dennoch bleibt eine Reihe von Fragen ungeklärt: Gibt es Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Dauer der Plateauphase? Erfolgt bei behandelten Tieren tatsächlich ein steilerer Abfall der Progesteronkonzentration? Welche Ursachen könnten diesem rapiden Abfall zugrunde liegen? Sowohl diese Fragen als auch die Prozesse der Regulation der Sekretion der Gonadotropine sind noch weitgehend ungeklärt und bedürfen weiterführender Untersuchungen.

Estradiol-17β

Die Konzentration von Estradiol-17β ist in ovarnah entnommenen Blutproben (Vena cava caudalis) höher als in peripher gewonnenen Proben (Vena jugularis). In der Jugularvene betrug die Konzentration während der frühen Lutealphase etwa 6 pg/ml, dahingegen waren in der Vena cava caudalis etwa dreifach höhere Werte nachweisbar (WALTERS und Mitarb., 1984, SCHALLENBERGER, 1990). In der vorliegenden Studie lag die Höhe der basalen Estrogenkonzentrationen in der Vena cava caudalis bei den unbehandelten Tieren über den in der Literatur angegebenen Werten aus der Vena jugularis (SCHALLENBERGER, 1990; BERGFELT und Mitarb., 1997). WALTERS und Mitarb. (1984) fanden in Abhängigkeit vom Zyklusstadium Estradiolkonzentrationen in der Vena cava caudalis, deren Niveau mit dem in der vorliegenden Studie vergleichbar ist.

Bei den Kontrolltieren wurden in der vorliegenden Untersuchung in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren zyklus- und follikelentwicklungsbedingte Schwankungen der Estradiol-17β-Konzentration festgestellt (WALTERS und Mitarb., 1984; WALTERS und

SCHALLENBERGER, 1984; RHODES und Mitarb., 1995; BERGFELT und Mitarb., 1997). Lediglich ein Tier zeigte nach dem Tag 18 keinen Anstieg der Konzentration an Estradiol-17 β .

Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der noch erhöhten Progesteronkonzentration bei diesem Tier, welche die Entwicklung eines estrogenaktiven Follikels gehemmt hat.

Nach Applikation des Decapeptyl® Depot waren bei den Versuchstieren im Verlauf der ersten Follikelreifungswelle ebenfalls follikelwachstumsabhängige Estrogenkonzentrationschwankungen zu beobachten. Es ist auffällig, dass diese Schwankungen nur in der frühen Lutealphase deutlich hervortraten. In der zweiten Zyklushälfte, etwa ab den Tagen 10 bzw. 11 war es dann nicht mehr möglich, follikelwachstumsbedingte Änderungen der Estrogenkonzentration zu beobachten. Dies ist durch die Unterdrückung der zyklischen Ovaraktivität begründet, die, wie bereits beschrieben, auch von anderen Autoren nachgewiesen wurde (D'OCCHIO und Mitarb., 1996; GONG und Mitarb., 1995; GONG und Mitarb., 1996; AMBROSE und Mitarb., 1998; RAJAMAHENDRAN und Mitarb., 1998). Die Ergebnisse aus einer Studie von ROBERSON und Mitarb. (1989) belegen, dass bei Kühen eine niedrigere Progesteronkonzentration zu einer höheren LH-Freisetzung führt, welche wiederum eine vermehrte Freisetzung von Estrogenen bewirkt. Analog dazu kann die erhöhte Progesteronkonzentration in der vorliegenden Studie dazu beigetragen haben, die Estrogenkonzentrationen gering zu halten. Diese geringe Konzentration an Estradiol-17 β könnte wiederum auch an der Verzögerung der Luteolyse bei den mit dem GnRH-Agonisten behandelten Tieren beteiligt sein. Anhaltspunkt dafür gibt die Tatsache, dass Estradiol sowohl die Bildung endometrialer Oxytozin-Rezeptoren als auch die Synthese von Prostaglandin F_{2 α} stimuliert (SILVIA und Mitarb., 1991; MANN und LAMMING, 1995a).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von BERGFELD und Mitarb. (1996a) kam es in der eigenen Untersuchung nicht zu einer initialen Erhöhung der Estrogenkonzentration unter dem Einfluss des GnRH-Agonisten in Depotformulierung und die Dauer der zyklusgerechten Estrogenschwankungen war verkürzt.

Wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, ist eine Beeinflussung der Estradiolproduktion durch die Pulsatilität der LH-Ausschüttung gegeben (WALTERS und Mitarb., 1984; RHODES und Mitarb., 1995). Aufgrund der Tatsache, dass es bei den mit Decapeptyl® Depot behandelten Tieren nicht möglich war, Schwankungen des Estradiol-17 β einer Follikelentwicklung zuzuordnen und aufgrund des Fehlens der pulsatischen LH-Sekretion kann durch die vorliegende Untersuchung diese Auffassung der Autoren unterstützt werden.

Die in der vorliegenden Untersuchung nach Applikation des GnRH-Agonisten beobachteten Veränderungen der Follikeldynamik nach dem Tag 0 und der Konzentration der korrespondierenden Gonadotropine und Steroide sind auf die Wirkung der applizierten Substanz zurückzuführen. Es kann dabei unterschieden werden zwischen Veränderungen, die aufgrund der ersten Wirkungsphase (Stimulation der Gonadotropinsekretion) und Veränderungen, die aufgrund der zweiten Wirkungsphase des Decapeptyl® Depot (Hemmung der Gonadotropinsekretion) hervorgerufen wurden. Zu den infolge der ersten Phase ablaufenden Veränderungen zählen die relative Synchronisation der Ovulationen, die Beeinflussung der Anzahl der in den einzelnen Größenklassen vorkommenden Follikel und die Stimulation der Sekretion des LH und des FSH unmittelbar nach der Applikation des GnRH-Agonisten.

Infolge der zweiten Phase der Wirkungsausprägung erfolgt die Unterdrückung des dynamischen Follikel-Turnover, die Unterdrückung der Entwicklung präovulatorischer Follikel und das Fehlen der Ovulation nach Ablauf einer physiologischen Zykluslänge, die Hemmung der pulsatischen LH-Sekretion. Ursache dieser Veränderungen ist die Down-Regulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren nach Applikation des GnRH-Agonisten in Depoformulierung.

Annett Bellmann

Follikeldynamik und korrespondierende Hormonkonzentrationen beim Rind unter dem Einfluss eines GnRH-Agonisten in Depotformulierung (Decapeptyl® Depot)

Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und Forschungsbereich Fortpflanzungsbiologie des Forschungsinstitutes für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf

92 Seiten, 25 Abbildungen, 18 Tabellen, 238 Literaturquellen, 1 Anhang

ZUSAMMENFASSUNG

In den vergangenen Jahren erlangte der Einsatz von langzeitaktiven GnRH-Agonisten im Rahmen der Beeinflussung von Reproduktionsprozessen zunehmende Bedeutung. Für einen effektiven und zielgerichteten Einsatz dieser Substanzen sind grundlegende Kenntnisse zur Wirkung auf die reproduktionsbiologischen Prozesse unerlässlich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein GnRH-Analogon in Depotformulierung an zyklische Jungrinder im präovulatorischen Zeitraum verabreicht, um neue Erkenntnisse über FSH- und LH-bedingte Prozesse der Follikelentwicklung und der Funktion des Corpus luteum zu gewinnen.

Für die Untersuchungen kamen 38 normozyklische Jungrinder der Rasse Deutsche Holstein zum Einsatz. Davon wurden 21 Tiere als Versuchstiere (V) verwendet, und 17 Tiere dienten als Kontrolltiere (K). Vor Versuchsbeginn erfolgte die Katheterisierung der Vena cava caudalis. Zwischen den Zyklustagen 10 und 14 wurde durch eine Injektion von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ die Luteolyse induziert. 60 Stunden später erfolgte bei den Versuchstieren die Applikation des Decapeptyl® Depot (7,5mg, i.m., Tag 0). Die Kontrolltiere erhielten zeitgleich das Lösungsmittel.

Um Aussagen über die Follikeldynamik treffen zu können, erfolgte die Ultraschalluntersuchung der Ovarien im periovulatorischen Zeitraum täglich und im Anschluss daran jeden zweiten Tag bis zum Versuchstag 21. Alle Ultraschalluntersuchungen wurden auf Video aufgezeichnet, die Auswertung wurde mit Hilfe einer Kombination aus der "identity method" und der "nonidentity method" (GINTHER, 1995) vorgenommen. Es erfolgte einerseits die Auswertung der zahlenmäßigen Entwicklung kleiner Follikel (1 bis 4 mm), mittelgroßer Follikel (4 bis 8 mm) und großer Follikel (> 8 mm). Andererseits wurden die Follikelreifungswellen durch die Parameter "Anzahl beteiligter Follikel", "Maximaler Durchmesser des dominanten Follikels (DF_{max})" und "Zeitpunkt der erstmaligen Feststellung des DF_{max} " charakterisiert.

Zur Bestimmung der basalen LH-Konzentration und der Konzentration der Steroide Progesteron (P_4) und Estradiol-17 β (E_2) wurde an den Tagen 0 bis 21 zweimal täglich Blut entnommen. Desweiteren erfolgte eine frequente Blutentnahme jeweils an den Tagen 0 bis 5, 11 und 15 im Abstand von 15 Minuten über die Dauer von 6 h, um Aussagen über die Pulsatilität der FSH- und LH-Ausschüttung treffen zu können. Zur Auswertung der pulsatilen Gonadotropinsekretion wurde das Pulsdetektionsprogramm PULSAR, 2.0 (MERRIAM und WACHTER, 1986) herangezogen. An den Tagen 1 bis 5, sowie 21 und 22 erfolgte die Schlachtung bzw. Kastration der Tiere. Dabei wurden die Ovarien einer makroskopischen Untersuchung unterzogen. Insgesamt gelangten die Daten von 34 Tieren (19 V und 15 K) zur Auswertung.

Alle Versuchstiere hatten unter dem Einfluss des GnRH-Agonisten in Depotformulierung im Zeitraum von 2 bis 4 Stunden nach der Applikation einen LH-Gipfel mit Maximalwerten bis 78 ng/ml. Im Anschluss daran ovulierten 95 % der Versuchstiere bis zum Tag 2 nach Applikation. Bei 67 % der Kontrolltiere konnte im Blutentnahmeintervall der endogene LH-

Gipfel zumindest teilweise nachgewiesen werden. Alle Kontrolltiere ovulierten bis zum Tag 3.

Die Untersuchung der Follikeldynamik post ovulationem ergab, dass die erste Follikelreifungswelle bei Versuchs- und Kontrolltieren gleichermaßen ablief. Demgegenüber war jedoch der Durchmesser des dominanten Follikels der zweiten Follikelreifungswelle unter dem Einfluss des Decapeptyl® Depot signifikant ($p \leq 0,05$) geringer als bei den Kontrolltieren.

Nach Ablauf von 21 Tagen hatten die Kontrolltiere frische Ovulationen bzw. präovulatorische Follikel ausgebildet, während die Versuchstiere weder Ovulationen noch präovulatorische Follikel aufwiesen.

Bezüglich der zahlenmäßigen Verteilung der Follikel können folgende Aussagen getroffen werden: Die Versuchstiere hatten im Vergleich zu den Kontrolltieren am Tag 2 eine signifikant ($p \leq 0,05$) höhere Gesamtanzahl an Follikeln. In der Gruppe der kleinen Follikel wiesen die Versuchstiere jeweils an den Tagen 2, 5 und 19 signifikant ($p \leq 0,05$) höhere Werte gegenüber den Kontrolltieren auf. Demgegenüber hatten die Kontrolltiere an den Tagen 0 und 15 signifikant ($p \leq 0,05$) mehr Follikel mittlerer Größe als die Versuchstiere. Die Kontrolltiere hatten desweiteren an den Tagen 2, 7 und 21 signifikant mehr große Follikel als die Versuchstiere.

Unter dem Einfluss des Decapeptyl® Depot konnte bei den Versuchstieren an den Tagen 1 bis 3 eine signifikante ($p \leq 0,05$) Erhöhung des LH-Basalniveaus festgestellt werden. Die Anzahl der LH-Pulse der Versuchstiere lag in allen untersuchten Zeiträumen (Tag 0 bis 5, 11 und 15) signifikant ($p \leq 0,05$) unter den Werten der Kontrolltieren. Die LH-Pulsamplituden waren bei den Versuchstieren an den Tagen 2 bis 5, 11 und 15 signifikant ($p \leq 0,05$) geringer als bei den Kontrolltieren. Die LH-Pulsflächen der Versuchstiere waren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 signifikant geringer als die LH-Pulsflächen der Kontrolltiere.

Die FSH-Sekretion wurde bei den Versuchstieren am Tag der Applikation des GnRH-Agonisten signifikant beeinflusst. Es wurden signifikant erhöhte Basalkonzentrationen bei gleichzeitig erniedrigten Pulsfrequenzen gemessen. An den anderen Tagen ist - mit Ausnahme einer signifikant geringeren FSH-Pulsamplitude der Versuchstiere am Tag 4 - keine Beeinflussung der FSH-Pulsatilität durch den GnRH-Agonisten aufgetreten.

Die Versuchstiere hatten in der Lutealphase eine höhere P_4 -Konzentration als die Kontrolltiere. An den Tagen 17 bis 19 waren die Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant ($p \leq 0,05$). Die Verringerung der P_4 -Konzentration setzte unter dem Einfluss des Decapeptyl® Depot bei den Versuchstieren zwei Tage später als bei den Kontrolltieren ein.

Die Konzentrationen des E_2 widerspiegeln bei den Kontrolltieren den Wachstumsverlauf des jeweils dominanten Follikels im Verlauf der beiden Follikelreifungswellen, während die Veränderungen der E_2 -Konzentration bei den Versuchstieren in der zweiten Zyklushälfte nicht mehr eindeutig dem Wachstum oder der Rückbildung eines dominanten Follikels zuzuordnen waren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen liefern Hinweise darauf, dass Decapeptyl® Depot seinen Einfluss auf die Follikeldynamik hauptsächlich über die Reduktion der LH-Pulsatilität infolge der Down-Regulation der hypophysären GnRH-Rezeptoren ausübt. Desweiteren bestätigen die Ergebnisse zur Follikeldynamik, dass die pulsatile LH-Sekretion für den physiologischen Ablauf der Follikelreifungswellen notwendig ist. Dies gilt im Gegensatz zu den bisherigen Vermutungen offenbar auch schon für Follikel mittlerer Größe. Diese Ergebnisse sollten durch die Untersuchung weiterer Tiere verifiziert werden. Darüber hinaus scheint die FSH-Synthese und -Freisetzung komplexer reguliert und weniger vom GnRH abhängig zu sein als die Synthese und Freisetzung des LH.

Annett Bellmann

Follicular dynamics and coincidental hormone concentrations in cattle under the influence of a GnRH agonist in depot formulation (Decapeptyl® Depot)

Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig
and Research Unit of the Research Institute for the Biology of Farm Animals Dummerstorf

92 pages, 25 figures, 18 tables, 238 references , 1 annex

Summary

Over the last years the use of GnRH agonists in sustained releasing formulations became more important in reproduction control programs. Basic knowledge of the effects of these substances on reproductive processes are needed for their effective application.

In this study a GnRH analog in depot formulation was given during the preovulatory period in cyclic heifers to get more information about the follicular development and the corresponding endocrine processes.

For the investigations a total of 38 cyclic heifers of the breed "Deutsche Holstein" were used. A number of 21 heifers were used as (GnRH-) treated heifers and 17 heifers were used as control heifers. Before the beginning of the investigations in all heifers the *Vena cava caudalis* was catheterised via the *Vena coccygea*. Luteolysis was induced between the days 10 and 14 of the estrous cycle using one injection of Prostaglandin F_{2α}. Sixty hours later treated heifers were injected with Decapeptyl® Depot (7,5mg, i.m., day 0). At the same time the control heifers got the solution medium (i.m.).

To get information about the follicular dynamics in treated and control heifers ultrasound examinations of the ovaries were performed. This examinations were done every day during the periovulatory period and, thereafter, every second day until day 21. Ultrasound scanning of the ovaries was recorded on video tape. Analysis of the follicular dynamics was done using a combination of both „nonidentity method“ and „identity method“ (GINTHER, 1995). The numbers of follicles of different size categories (1 to 4 mm; 4 to 8 mm; > 8 mm) were counted. Furthermore a characterisation of the follicular waves was performed using the parameters „number of follicles per wave“, „maximum diameter of the dominant follicle (DF_{max})“ and „time of first detection of the dominant follicle“.

For the analysis of the basal LH concentration and the concentrations of the steroid hormones progesterone (P₄) and estradiol-17β (E₂) blood sampling was done twice daily on days 0 to 21. To investigate the pulsatility of FSH and LH secretion a frequent blood sampling protocol was performed on days 0 to 5, 11 and 15, every 15 minutes. The pulsatility of the gonadotropin secretion was analysed using the pulse detection program PULSAR, 2.0 (MERRIAM und WACHTER, 1986). On days 1 to 5, 21 and 22 the heifers were slaughtered or castrated and the ovaries were macroscopically examined. A total of 34 animals (19 treated and 15 control heifers) were used for this investigations.

Under the influence of the GnRH agonist in depot formulation all treated heifers showed a LH peak with maximum values up to 78 ng/ml 2 to 4 hours after treatment. After this LH peak ovulation occurred in 95 % of the treated heifers until day 2 after treatment. In 67 % of the control heifers the endogenous LH peak, or at least a part of it, took place during the period of the frequent blood sampling. All of the control heifers had a spontaneous ovulation until day 3.

Both, treated and control heifers, showed the same pattern concerning the first wave of follicular development. However, the second wave of follicular development was different

between treated and control heifers. Under the influence of Decapeptyl® Depot the maximum diameter of the dominant follicle of the second follicular wave was significantly lower ($p \leq 0,05$) than in control heifers. After 21 days in control heifers ovulation occurred or the presence of a preovulatory follicle was detected, while the treated heifers had neither ovulations nor development of preovulatory follicles.

The numbers of follicles in the different size classes were as follows: The treated heifers had a significant higher total number of follicles than the control heifers on day 2. Concerning the class of small follicles, the treated heifers had significant higher numbers ($p \leq 0,05$) on days 2, 5 and 19 in comparison to the control heifers. Otherwise, the control heifers had significant more medium sized follicles ($p \leq 0,05$) than the treated heifers on days 0 and 15. Furthermore the control heifers had a significant higher number of follicles > 8 mm ($p \leq 0,05$) than the treated heifers on days 2, 7 and 21.

Under the influence of Decapeptyl® Depot in treated heifers was found a significant higher ($p < 0,05$) LH basal level on days 1 to 3 than in control heifers. The number of LH pulses in treated heifers during the frequent blood sampling intervals on days 0 to 5, 11 and 15 was always lower than the number of LH pulses in control heifers. The amplitudes of the LH pulses in treated heifers were significant lower ($p \leq 0,05$) on days 2 to 5, 11 and 15 in comparison to the control heifers. On days 1 to 5, 11 and 15 the treated heifers had significant lower ($p \leq 0,05$) values of the area of LH pulses than in the control heifers.

On the day of application of the GnRH agonist the secretion of FSH in treated heifers was significantly influenced, as indicated by significant higher basal FSH concentrations and significant lower frequency of FSH pulses on day 0 in comparison to the control heifers. On the other days no influence of the treatment with Decapeptyl® Depot was found on the pulsatility of FSH secretion with exception of a significant lower FSH pulse amplitude in treated heifers on day 4.

During the luteal phase treated heifers had a higher level in P_4 concentrations than the control heifers. On days 17 to 19 the differences between both groups were significant ($p \leq 0,05$). Under the influence of the GnRH agonist the decline in P_4 concentrations began two days later than in control heifers.

The concentrations of E_2 reflected the growing process of the dominant follicle of the first and the second follicular wave in the control heifers, while changes in E_2 concentrations in treated heifers were not a clear reflection of the process of dominant follicle growth.

The results of the present study implicate, that the influence of Decapeptyl® Depot on follicular dynamics is mainly mediated through the reduction of the LH pulsatility following down regulation of the pituitary GnRH receptors. Furthermore, the findings concerning follicular dynamics show, that a pulsatile LH secretion is essential for a normal wave-like pattern of the follicular development. Unlike recent assumptions there is strong evidence that the pulsatile LH secretion also is necessary for the growth of medium sized follicles. Nevertheless, more treated and control animals should be investigated to confirm the results. Furthermore, the synthesis and release of FSH seems to be more complex regulated and less dependent on GnRH in comparison to the synthesis and release of LH.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH (1992a): Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **94**, 177-188

Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ (1992b): Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **95**, 627-640

Ahmad N, Townsend EC, Dailey RA, Inskeep EK (1997): Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **49**, 13-28

Alila HW und Hansel W (1984): Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* **31**, 1015-1025

Ambrose JD, Pires MFA, Moreira F, Diaz T, Binelli M, Thatcher WW (1998): Influence of Deslorelin (GnRH-Agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* **50**, 1157-1170

Armstrong DG und Webb R (1997): Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction* **2**, 139-146

Aspden WJ, Rao A, Scott PT, Clarke IJ, Trigg TE, Walsh J, D'Occhio MJ (1996): Direct actions of the luteinizing hormone-releasing hormone Agonist, Deslorelin, on anterior pituitary contents of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), LH and FSH subunit messenger ribonucleic acid, and plasma concentrations of LH and FSH in castrated male cattle. *Biol. Reprod.* **55**, 386-392

Aspden WJ, Rao A, Rose K, Scott PT, Clarke IJ, Trigg TE, Walsh J, D'Occhio MJ (1997): Differential responses in anterior pituitary luteinizing hormone (LH) content and LH β - and LH α -subunit mRNA, and plasma concentrations of LH and Testosterone, in bulls treated with the LH-releasing hormone agonist Deslorelin. *Domest. Anim. Endocrinol.* **14**, (6) 429-437

Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De la Sota RL, Thatcher WW (1992): Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* **47**, 871-883

Baird DT, Swantson J, Sacramuzzi RJ (1976): Pulsatile release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the late luteal phase of estrous cycle. *Endocrinology* **98**, 1490-1496

Baird DT und McNeilly AS (1981): Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* **30**, 119-133

Baird DT (1992): Luteotrophic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* **28**, 95-102

Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Younquist RS (1997): Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* **56**, 1158-1168

Bao B und Garverick HA (1998): Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves. A review. *J. Anim. Sci.* **76**, 1903-1921

Beard AJ, Casillo RJ, Mc Leod BJ, Glenncross RG, Knight PG (1990): Comparison of the effects of crude and highly purified inhibin (M_r 32,000) on plasma concentrations of FSH and LH in chronically ovariectomized prepubertal heifers. *J. Endocrinol.* **125**, 21-30

Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ (2001): Follicular-fluid factors and granulosa-cells gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol. Reprod.* **64**, 432-441

Beckers JF, Drion PV, Figueiredo JR, Goffin L, Pirottin D, Ectors FJ (1996): The ovarian follicle in cow: In vivo growth and in vitro culture. *Reprod. Dom. Anim.* **31**, 543-548

Bergfeld EGM, D'Occhio MJ, Kinder JE (1996a): Pituitary function, ovarian follicular growth and plasma concentrations of 17 β -estradiol and progesterone in prepubertal heifers during and after treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone agonist Deslorelin. *Biol. Reprod.* **54**, 776-782

Bergfeld EGM, D'Occhio MJ, Kinder JE (1996b): Continued desensitization of the pituitary gland in young bulls after treatment with the luteinizing hormone-releasing hormone agonist Deslorelin. *Biol. Reprod.* **54**, 769-775

Bergfeld EGM, Kojima FN, Cupp AS, Wehrmann ME, Peters KE, Mariscal V, Sanchez T, Kinder JE (1996c): Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 β -estradiol in bovine females. *Biol. Reprod.* **54**, 546-553

Bergfelt DR, Smith CA, Adams GP, Ginther OJ (1997): Surges of FSH during the follicular and early luteal phases of the estrous cycles in heifers. *Theriogenology* **48**, 757-768

Besecke LM, Guendner JM, Schneyer AL, Bauer-Dantoin C, Jameson JL, Weiss J (1996): gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone- β gene expression through an activin/follistatin autocrine or paracrine loop. *Endocrinology* **137**, 3667-3673

Blake (1998): Control of gonadotropin secretion. In: Knobil E und Neill JD (Hrsg.) *Encyclopedia of Reproduction* (2) Academic Press, San Diego S. 528 ff

Blödow G, Götze M, Kitzig M, Brüssow K-P, Duschinski U (1988): Radioimmunologische Steroidhormonbestimmung in der Follikelflüssigkeit bei Rind und Schwein. *Isotopenpraxis* **24**, 151-155

Bo GA, Adams GP, Caccia C, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ (1995): Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **39**, 193-204

Bodensteiner KJ, Wiltbank MC, Bergfelt DR, Ginther OJ (1996): Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology* **45**, 499-512

Brown JL und Reeves JJ (1983): Absence of specific luteinizing hormone releasing hormone receptors in ovine, bovine and porcine ovaries. *Biol. Reprod.* **29**, 1179-1182

Burgus R, Butcher M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Amoss M, Blackwell, Vale WW, Guillemin R (1971): Structure moléculaire du facteur hypothalamique (LFR) d'origine ovine contrôlant la sécrétion de l'hormone gonadotrope hypophysaire de lutéinisation (LH). *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D* **273**, 1611-1613

Burke CR, Mihm M, Macmillan KL, Roche JF (1994): Some effects of prematurely elevated concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the estrous cycle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **35**, 27-39

Burke CR, Macmillan KL, Boland MP (1996): Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. *Anim. Reprod. Sci.* **45**, 13-28

Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R (1995): Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil.* **49**, 335-350

Campbell BK und McNeilly AS (1996): Follicular dominance and oocyte maturation. *Zygote* **4**, 327-334

Campbell BK, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ (1999): Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fertil.* **117**, 355-367

Carr BR (1992): Disorders of the ovary and female reproductive tract. In: Wilson, JD und Foster DW (Hrsg.) *Williams Textbook of Endocrinology* 8. Aufl. S. 733 ff

Cassina MP und Neill JD (1996): Gonadotropin-releasing hormone-induced desensitization may account for the decrease in pituitary responsiveness after preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* **137**, 1057-1062

Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, Goodwin MC (1990): LH and FSH response of Holstein heifers to Fertirelin Acetate, Gonadorelin and Buserelin. *Theriogenology* **34**, 81-98

Childs GV (1998): Gonadotropes. In: Knobil E und Neill JD (Hrsg.) *Encyclopedia of Reproduction* (2) Academic Press, San Diego S. 498 ff

Clarke IJ, Cummins JT, de Kretser DM (1983): Pituitary gland function after disconnection from direct hypothalamic influences in the sheep. *Neuroendocrinology* **36**, 376-384

- Clayton RN und Catt KJ** (1981): Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr. Rev.* **2**, 186-209
- Clayton RN** (1988): Mechanism of GnRH action in gonadotrophs. *Hum. Reprod.* **3**, 479-483
- Clayton RN** (1989): Gonadotropin-releasing hormone: Its actions and receptors. *J. Endocrinol.* **120**, 11-19
- Conn PM, Rogers DC, Seay SG** (1984): Biphasic regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor by receptor microaggregation and intracellular Ca^{2+} levels. *Mol. Pharmacol.* **25**, 51-55
- Conn PM und Crowley WF Jr.** (1991): Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N. Engl. J. Med.* **324**, 93-103
- Cooke DJ, Crowe MA, Roche JL, Headon DR** (1996): Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* **41**, 77-99
- Cupp AS, Stump TT, Kojima FN, Werth LA, Wolfe MW, Robertson MS, Kittok RJ, Kinder JE** (1995): Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes of progesterone or 17- β oestradiol. *Anim. Reprod. Sci.* **37**, 109-119
- Deaver DR** (1995): A new non-isotopic detection system for immunoassays. *Nature* **377**, 758-760
- De Rensis F und Peters AR** (1999): The control of follicular dynamics by $\text{PGF}_{2\alpha}$, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* **34**, 49-59
- Diaz T, Schmitt EJ-P, de la Sota RL, Thatcher M-J, Thatcher WW** (1998): Human chorionic gonadotropin-induced alterations in ovarian follicular dynamics during the estrous cycle of heifers. *J. Anim. Sci.* **76**, 1929-1936
- Dobson H, Campell BK, Sacramuzzi RJ** (1997): Use of a GnRH antagonist in conjunction with low amplitude, high frequency LH pulses to induce follicular growth without a LH surge and ovulation in ewes. *Anim. Reprod. Sci.* **46**, 213-222
- Donaldson L und Hansel W** (1965): Histological study of bovine corpora lutea. *J. Dairy Sci.* **48**, 905-909
- D'Occhio MJ, Grifford DR, Earl CR, Weatherly T, von Rechenberg W** (1989): Pituitary and ovarian responses of post-partum acyclic beef cows to continuous long-term GnRH and GnRH agonist treatment. *J. Reprod. Fertil.* **85**, 495-502
- D'Occhio MJ, Aspden WJ, Whyte TR** (1996): Controlled, reversible suppression of estrous cycles in beef heifers and cows using agonists of gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* **74**, 218-225

- D'Occhio MJ und Aspden WJ** (1996): Characteristics of luteinizing hormone (LH) and testosterone secretion, pituitary responses to LH-releasing hormone (LHRH), and reproductive function in young bulls receiving the LHRH agonist deslorelin: effect of castration on LH responses to LHRH. *Biol. Reprod.* **54**, 45-52
- D'Occhio MJ, Fordyce G, Whyte TR, Aspden WJ, Trigg TE** (2000): Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Anim. Reprod. Sci.* **60-61**, 433-442
- Döcke F** (1994): Keimdrüsen **In:** Döcke F (Hrsg.) *Veterinärmedizinische Endokrinologie* 3. Aufl. *Gustav Fischer Verlag Jena* (1994), S. 399ff
- Driancourt MA und Fry RC** (1988): Differentiation of ovulatory follicles in sheep. *J. Anim. Sci.* **66**, 9-20
- Driancourt MA** (1991): Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* **35**, 55-77
- Driancourt MA und Thuel B** (1998): Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review *Reprod. Nutr. Dev.* **38**, 345-362
- Dufour JJ, Mermillod P, Mariana J-C, Touze J-L, Guenette C, Thomas A, Derwin C** (1997): Effect of GnRH agonist on follicular dynamics and response to FSH stimulation in prepubertal calves. *Theriogenology* **47**, 170
- Erickson BH** (1966): Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* **25**, 800-805
- Evans ACO und Rawlings NC** (1994): Effects of a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist (Leuprolide) on ovarian follicular development in prepubertal heifer calves. *Can. J. Anim. Sci.* **74**, 649-656
- Evans AC, Adams GP, Rawlings NC** (1994): Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J. Reprod. Fertil.* **102**, 463-470
- Evans ACO, Komar CM, Wandji SA, Fortune JE** (1997): Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.* **57**, 394-401
- Farin CE, Moeller CL, Mayan H, Gamboni F, Sawyer HR, Niswender GD** (1988): Effect of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on cell populations in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* **38**, 413-421
- Farnworth PG** (1995): Gonadotrophin secretion revisited. How many ways can FSH leave a gonadotroph? *J. Endocrinol.* **145**, 387-395
- Finnerty M, Enright WJ, Roche J F** (1998): Testosterone, LH and FSH episodic secretory patterns in GnRH-immunized bulls. *J. Reprod. Fertil.* **114**, 85-94
- Fitz TAM, Sawyer MH, Niswender GD** (1982): Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* **27**, 703-711

Ford JJ und Howard HJ (1997): Activin inhibition of estradiol and progesterone production in porcine granulosa cells. *J. Anim. Sci.* **75**, 761-766

Fortune JE, Sirois J, Quirk SM (1988): The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* **29**, 95-109

Fortune JE, Sirois J, Turzillo AM, Lavoie M (1991): Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.* **43**, 187-198

Fortune JF (1994): Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* **50**, 225-232

Genazzani AD, Massolo F, Ferrari E, Gandolfi A, Petraglia F, Genazzani AR (1996): Long-term GnRH-agonist administration revealed a GnRH-independent mechanism stimulating FSH discharge in humans. *Eur. J. Endocrinology* **134**, 77-83

Gibbons JR, Wiltbank MC, Ginther OJ (1997): Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the FSH surge in heifers. *Biol. Reprod.* **57**, 1066-1073

Gibbons JR, Wiltbank MC, Ginther OJ (1999): Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod.* **60**, 72-77

Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L (1989a): Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* **20**, 187-200

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989b): Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* **87**, 223-230

Ginther OJ (1995): Follicular data. In: *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Fundamentals*, Wisconsin (Madison)

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K (1996a): Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* **55**, 1187-1194

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Martin S, Wiltbank MC (1996b): Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fertil.* **108**, 271-279

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC (1997): Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* **48**, 75-87

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K (1998): Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology* **50**, 507-519

Gong JG, Bramley TA, Webb R (1991): The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. *Biol. Reprod.* **45**, 941-949

Gong JG, Bramley TA, Webb R (1993): The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 247-254

Gong JG, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R (1995): Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **105**, 263-270

Gong JG, Campell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R (1996): Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone Agonist. *Biol. Reprod.* **55**, 68-74

Grasselli F, Baratta M, Tamanini C (1993): Effects of GnRH analogue (Buserelin) infused via osmotic minipumps on pituitary and ovarian activity of prepubertal heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **32**, 153-161

Gregg DW, Nett TM (1989): Direct effects of estradiol-17b on the number of gonadotropin-releasing hormone receptors in the ovine pituitary. *Biol. Reprod.* **40**, 288-293

Gregg DW, Schwall RH, Nett TM (1991): Regulation of gonadotropin secretion and number of gonadotropin-releasing hormone receptors by inhibin, activin-A, and estradiol. *Biol. Reprod.* **44**, 725-732

Handelsman DJ, Swerdloff RS (1986): Pharmacokinetics of gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Endocr. Rev.* **7**, 95-105

Hansel W, Alila HW, Dowd JP, Milvae RA (1991): Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl.) **43**, 77-89

Hawes BE, Marzen JE, Waters SB, Conn PM (1992): Sodium fluoride provokes gonadotrope desensitization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotrope sensitization to A23187: Evidence for multiple G proteins in GnRH action. *Endocrinology* **130**, 2465-2475

Hazum E, Cuatrecasas P, Marian J, Conn PM (1980): Receptor-mediated internalization of gonadotropin-releasing hormone by pituitary gonadotropes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **77**, 6692-6695

Hazum E und Conn PM (1989): Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. I. The GnRH receptor. *Endocr. Rev.* **10**, 229-236

Henderson KM und Franchimont P (1983): Inhibin production by bovine ovarian tissue in vitro and its regulation by androgens. *J. Reprod. Fertil.* **67**, 291-298

Hirshfield Newman A (1991): Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytology* **124**, 43-101

Hodgen GD (1982): The dominant ovarian follicle. *Fert. Steril.* **38**, 281-300

Hooijer GA, Frankena K, Valks MM, Schuring M (1999): Treatment of cystic ovarian disease in dairy cows with gonadotrophin-releasing hormone: a field study. *Vet. Q.* **21**, 33-37

Hotta M, Takahashi T, Maruyama S, Hirako M, Hashizume K, Hasegawa Y, Domeki I (1995): Ovarian function following a long-acting gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonist treatment in Japanese-Black cows. *J. Reprod. Fertil. (Abstr. Ser.)* **16**, 29

Hsueh AJW und Jones PBC (1981): Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr. Rev.* **2**, 437-461

Igarashi M (1988): Control mechanism of FSH secretion from the pituitary. *Acta Obstet. Gynecol. Jpn.* **40**, 973-978

Inskeep EK, Ahmad N, Beam SW, Butler WR, Deaver DR, Duby RT, Elder DR, Fortune JE, Griel LC Jr., Jones LS, Milvae RA, Pate JL, Revah I, Schreiber DT Jr., Townson DH, Tsang PCW (1996): Cooperative Regional Research Project, NE-161: Relationship of fertility patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *J. Anim. Sci.* **74**, 1943-1952

Ireland JJ und Roche JF (1982a): Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **64**, 295-302

Ireland JJ und Roche JF (1982b): Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* **111**, 2077-2086

Ireland JJ und Roche JF (1983a): Development of nonovulatory antral follicles in heifers: Changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* **112**, 150-156

Ireland JJ und Roche JF (1983b): Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J. Anim. Sci.* **57**, 157-167

Ireland JJ (1987): Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil.* **34**, 39-54

Ireland JJ, Milvea RA, Martin, TL, Aten RF, Behrman HR (1990): Effect of histone H2 α on progesterone production by bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* **43**, 1058-1063

Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF (2000): Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: Key concepts, studies, advancements, and terms. *J. Dairy Sci.* **83**, 1648-1658

Jayes FCL, Britt JH, Esbenshade KL (1997): Role of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in differential regulation of gonadotropins in the gilt. *Biol. Reprod.* **56**, 1012-1019

- Jou P, Buckrell BC, Liptrap RM, Summerlee AJ, Johnson WH** (1999): Evaluation of the effect of GnRH on follicular ovarian cysts in dairy cows using transrectal ultrasonography. *Theriogenology* **52**, 923-937
- Kähn W** (1989): Die Entwicklung von Follikeln beim Rind; Veränderungen ihrer Anzahl und Größe während des Ovarialzyklus. *Berl. Mün. Tierärztl. Wochenschr.* **102**, 044-049
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW** (1993): Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology* **133**, 931-934
- Kaneko H, Nakanishi Y, Akagi S, Arai K, Taya K, Watanabe G, Sasamoto S, Hasegawa Y** (1995): Immunoneutralization of inhibin and estradiol during the follicular phase of the estrous cycle in cows. *Biol. Reprod.* **53**, 931-939
- Kaneko H, Taya K, Watanabe G, Noguchi J, Kiguchi K, Shimada A, Hasegawa Y** (1997): Inhibin is involved in the suppression of FSH secretion in the growth phase of the dominant follicle during the early luteal phase in cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* **14**, 263-271
- Kanitz E, Kanitz W, Delzer W, Schmidt HE, Kitzig M, Schneider F** (1990): Die Nutzung der LH-Analytik zur Bestimmung des optimalen Besamungszeitraumes nach Superovulationsbehandlungen. *Monatsh. Veterinärmed.* **45**, 123-125
- Kanitz W, Mildner H, Freymann U, Kanitz E, Schneider F, Becker F** (1996): Untersuchungen zum Ovulationszeitraum nach induzierter Luteolyse beim Rind in Abhängigkeit vom Zyklusstadium. *Züchtungskunde* **68**, 268-279
- Karg H, Hartl M, Hoffmann B, Schams D, Schmidt W, Günzler O, Huber E, Müller S** (1976): Versuche mit einem Prostaglandinanalogue zur Zyklussynchronisation beim Rind unter hormonanalytischer und klinischer Kontrolle. *Zuchthygiene* **11**, 7-18
- Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM** (1997): Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.* **56**, 303-309
- Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ** (1990): Suppression of the dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology* **34**, 499-509
- Katt JA, Duncan JA, Herbon L, Barkan A, Marshall JC** (1985): The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* **116**, 2113-2115
- Kesner JS, Convey EM, Anderson CR** (1981): Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology* **108**, 1386-1391
- Kiesel und Runnebaum** (1992): Gonadotropin-releasing-Hormon und Analoga. *Gynaekol. Geburtsh. Rundsch.* **32**, 22-20

Knopf L, Kastelic JP, Schallenberger E, Ginther OJ (1989): Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* **6**, 111-119

Kogawa K, Nakamura T, Sugino K, Takio K, Titani K, Sugino H (1991): Activin-binding protein is present in the pituitary. *Endocrinology* **128**, 1434-1440

Kotwica und Williams (1982): Relationship of plasma testosterone concentrations to pituitary-ovarian hormone secretion during the bovine estrous cycle and the effects of testosterone propionate administration during luteal regression. *Biol. Reprod.* **27**, 790-801

Laws SC, Beggs MJ, Webster JC, Miller WL (1990): Inhibin increases and progesterone decreases receptors for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary culture. *Endocrinology* **127**, 373-380

Leshin LS, Rund LA, Crim JW, Kiser TE (1988): Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone and proopiomelanocortin neurons within the preoptic area and hypothalamus of the bovine brain. *Biol. Reprod.* **39**, 4963-4975

Lincoln DW, Fraser HM, Lincoln GA, Martin GB, McNeilly AS (1985): Hypothalamic pulse generators. *Recent Prog. Horm. Res.* **41**, 369-419

Loumaye E und Catt KJ (1982): Homologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells. *Science* **215**, 983-985

Loumaye E (1990): The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum. Reprod.* **5**, 357-376

Lucy MC, Savio JD, Badinga L, de la Sota RL, Thatcher WW (1992): Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* **70**, 3615-3626

Maclellan LJ, Bergfeld EGM, Earl CR, Fitzpatrick LA, Aspden WJ, Kinder LE, Walsh J, Trigg TE, D'Occhio MJ (1997): Influence of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist, deslorelin, on patterns of estradiol-17 β and luteinizing hormone secretion, follicular responses to superstimulation with follicle-stimulating hormone, and recovery and in vitro development of oocytes in heifer calves. *Biol. Reprod.* **56**, 878-884

Macmillan KL, Day AM, Taufa VK, Gibb M, Pearce MG (1985): Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone in cattle. I. Hormone concentrations and oestrous cycle length. *Anim. Reprod. Sci.* **8**, 203-212

Macmillan KL und Thatcher WW (1991): Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* **45**, 883-889

Mann GE, Lamming GE, Payne HJ (1998): Role of early luteal phase progesterone in control of the timing of the luteolytic signal in cows. *J. Reprod. Fertil.* **113**, 47-61

Mann GE und Lamming GE (1995a): Effect of the level of oestradiol on oxytocin-induced prostaglandin F_{2 α} release in the cow. *J. Endocrin.* **145**, 175-180

- Mann GE und Lamming GE** (1995b): Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *J. Reprod. Fertil.* **104**, 1-5
- Mann GE, Lamming GE, Fray MD** (1995): Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy and the effects of treatment with buserelin. *Anim. Reprod. Sci.* **37**, 121-131
- Manns JG, Niswender GD, Braden T** (1984): FSH receptors in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* **22**, 321-328
- Marian J, Cooper RL, Conn PM** (1981): Regulation of the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol. Pharmacol.* **19**, 399-405
- Martin GB, Price CA, Thiery JC, Webb R** (1988): Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotropin secretion in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* **82**, 319-328
- Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV** (1971): Structure of porcine LH and FSH releasing factor. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 1334-1339
- Matton P, Adelakuon V, Couture Y, Dufour JJ** (1981): Growth and replacement of bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* **52**, 813-820
- McCann SM, Taleisnik S, Friedman HM** (1960): LH-releasing activity in hypothalamic extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**, 432-434
- McCann SM, Marubayashi U, Sun HQ, Yu WH** (1993): Control of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release by hypothalamic peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **687**, 55-59
- Mc Leod BJ, Peters AR, Haresign W, Lamming GE** (1985): Plasma LH and FSH responses and ovarian activity in prepubertal heifers treated with repeated injections of low doses of GnRH for 72 h. *J. Reprod. Fertil.* **74**, 589-596
- Mc Leod BJ, Dodson SE, Peters AR, Lamming GE** (1991): Effect of a GnRH agonist (Buserelin) on LH secretion in post-partum beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* **24**, 1-11
- McNatty KP, Heath DA, Lun S, Fannin J, McDiarmid M, Henderson KM** (1984): Steroidogenesis by bovine theca interna in an in vitro perfusion system. *Biol. Reprod.* **30**, 159-170
- McNeilly AS** (1988) The control of FSH secretion. *Acta Endocrin. (Copenh.)* **288**, 31-40
- McNeilly JR, Fraser HM** (1987): Effect of gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced suppression of LH and FSH on follicle growth and corpus luteum function in the ewe. *J. Endocrinol.* **115**, 273-282
- McNeilly AS, Picton HM, Campbell BK** (1991): Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* **43**, 177-186

- McNeilly AS, Crow WJ, Fraser HM** (1992): Suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion by gonadotrophin-releasing hormone antagonist does not affect episodic progesterone secretion or corpus luteum function in ewes. *J. Reprod. Fertil.* **96**, 865-874
- Mee MO, Stevenson JS, Alexander BM, Sasser RG** (1993): Administration of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, Estradiol-17 β , Pregnancy-specific protein B, and progesterone, proportion of luteal cell types, and In vitro production of progesterone in dairy cows. *J. Anim. Sci.* **71**, 185-198
- Merriam GR und Wachter KW** (1982): Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am. J. Physiol.* **243**, E310-E318
- Mihm M, Good TEM, Ireland JLH, Ireland JJ, Knight PG, Roche JF** (1997): Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* **57**, 1328-1337
- Mihm M, Diskin MG, Roche JF** (1996): Regulation of follicle wave growth in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* **31**, 531-538
- Milvae RA, Murphy BD, Hansel W** (1984): Prolongation of the bovine estrous cycle with a gonadotropin-releasing hormone analog. *Biol. Reprod.* **31**, 664-670
- Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ** (1992): Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology* **130**, 2978-2984
- Monniaux D, Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C** (1997): Growth factors and antral follicle development in domestic ruminants. *Theriogenology* **47**, 3-12
- Moser MT, Garverick HA, Smith MF, Youngquist RS** (1989): Follicular growth and endocrine patterns of prepuberal heifers administered bovine follicular fluid and (or) follicle stimulating hormone. *Anim. Reprod. Sci.* **18**, 227-242
- Murphy MG, Enright WJ, Crowe MA, McConnell K, Spicer LJ, Boland MP, Roche JF** (1991): Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.* **92**, 333-338
- Nett TM, Cermak D, Braden T, Manns J, Niswender G** (1987): Pituitary receptors for GnRH and estradiol, and pituitary content of gonadotropins in beef cows. I. Changes during the estrous cycle. *Domest. Anim. Endocrinol.* **4**, 123-132
- Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC** (1994): Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* **50**, 239-247
- Niswender GD, Schwall RH, Fitz TA, Farin CE, Sawyer, HR** (1985): Regulation of luteal function in domestic ruminant: New concepts. In: Greep RO (Hrsg.) *Recent Prog. Horm. Res.* **41**, 101-151 Academic Press, New York

- Padmanabhan V, Convey FM, Ireland JJ** (1984): Changes in inhibin-like bioactivity in ovulatory and atretic follicles and utero-ovarian venous blood after prostaglandin-induced luteolysis in heifers. *Endocrinology* **115**, 1332-1340
- Padmanabhan, V., McFadden, K., Evans MP, Dahl GE, Mauger, D.T., Karsch, F.J.** (1994): Pulsatile FSH secretion in the ovariectomized ewe is controlled by both GnRH-dependent and GnRH-independent mechanisms. *Society of Neuroscience Abstracts* **20**, 1058
- Padmanabhan V, McFadden K, Mauger DT, Karsch FJ, Midgley JAR** (1997): Neuroendocrine control of follicle-stimulating hormone secretion. 1. Direct evidence for separate episodic and basal components of FSH secretion. *Endocrinology* **138**, 424-432
- Peters KE, Bergfeld EG, Cupp AS, Kojima FN, Mariscal V, Sanchez T, Wehrman ME, Grotjan HE, Hamernik D, Kinder JE** (1993): Pulsatile secretion of LH is necessary for the development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. *J. Anim. Sci. (Suppl.)* **71**, 216
- Peters KE, Bergfeld EG, Cupp AS, Kojima FN, Mariscal V, Sanchez T, Wehrman ME, Grotjan HE, Hamernik D, Kinder JE** (1994): Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea but is not required to maintain CL function in heifers. *Biol. Reprod.* **51**, 1248-1254
- Picton HM, Tsonis CG, McNeilly AS** (1990a): FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Endocrinol.* **126**, 297-307
- Picton HM, Tsonis CG, McNeilly AS** (1990b): The antagonistic effect of exogenous LH pulses on FSH-stimulated preovulatory follicle growth in ewes chronically treated with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Endocrinol.* **127**, 273-283
- Picton HM und McNeilly AS** (1991): Effect of basal and pulsatile LH release on FSH-stimulated follicle growth in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Endocrinol.* **128**, 449-456
- Pierson RA und Ginther OJ** (1984): Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* **21**, 495-504
- Pierson RA und Ginther OJ** (1987a): Follicular populations during the estrous cycle in heifers: I. Influence of day. *Anim. Reprod. Sci.* **14**, 165-176
- Pierson RA und Ginther OJ** (1987b): Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* **28**, 929-936
- Pierson RA und Ginther OJ** (1988a): Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* **29**, 21-37
- Pierson RA und Ginther OJ** (1988b): Follicular populations during the estrous cycle in heifers. III. Time of selection of the ovulatory follicle. *Anim. Reprod. Sci.* **16**, 81-95

Pincus SM, Padmanabhan V, Lemon W, Randolph J, Midgley AR (1998): Follicle-stimulating hormone is secreted more irregularly than luteinizing hormone in both humans and sheep. *J. Clin. Invest.* **101**, 1318-1324

Prendiville DJ, Enright WJ, Finnerty M, Crowe MA, Roche JF (1996): Normal or induced secretory patterns of luteinising hormone and follicle-stimulating hormone in anoestrous gonadotrophin-releasing hormone-immunised and cyclic control heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **45**, 177-190

Price CA und Webb R (1988): Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. *Endocrinology* **122**, 2222-2231

Rahe CH, Owens RE, Fleeger JL, Newton HJ, Harms PR (1980): Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of cycle. *Endocrinology* **107**, 498-503

Rajakoski E (1960): The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrin.* **52**, 7-68

Rajamahendran R und Sianangama PC (1992): Effect of human chorionic gonadotropin on dominant follicles in cows: formation of accessory corpora lutea, progesterone production and pregnancy rates. *J. Reprod. Fertil.* **95**, 577-584

Rajamahendran R, Ambrose JD, Schmitt EJ-P, Thatcher M-J, Thatcher WW (1998): Effects of Buserelin injection and Deslorelin (GnRH-Agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* **50**, 1141-1155

Reichlin S (1992): Hypophyseotropic hormones of the hypothalamus. In: Wilson, JD und Foster DW (Hrsg.) *Williams Textbook of Endocrinology* 8. Aufl. S. 154ff

Rhodes FM, Fitzpatrick LA, Entwistle KW, Kinder JE (1995): Hormone concentrations in the caudal vena cava during the first ovarian follicular wave of the estrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **104**, 33-39

Richards JS (1980): Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* **60**, 51-89

Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB (1987): Ovarian follicular development: From physiology to molecular biology. *Rec. Prog. Horm. Res.* **43**, 231-276

Rivier C und Vale W (1991): Effect of recombinant inhibin on follicle stimulating hormone secretion by the female rat: interaction with a gonadotrophin-releasing hormone antagonist and estrogen. *Endocrinology* **129**, 2160-2165

Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Kittok RJ, Kinder JE (1989): Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol. Reprod.* **41**, 997-1003

- Robertson DM, Prisk M, McMaster JW, Irby DC, Findlay JK, deKretser DM** (1991): Serum FSH-suppressing activity of human recombinant inhibin A in male and female rats. *J. Reprod. Fertil.* **91**, 321-328
- Roche JF** (1996): Control and regulation of folliculogenesis. *Reviews of Reproduction* **1**, 19-27
- Roche JF und Ireland JJ** (1981): The differential effect of progesterone on concentrations of luteinising hormone and follicle stimulating hormone in heifers. *Endocrinology* **108**, 568-572
- Roche JF, Mihm M, Diskin M, Ireland JJ** (1998b): A review of regulation of follicle growth in cattle. *J. Anim. Sci.* **76**, 16-29
- Roche JF, Austin E, Ryan M, O'Rourke M, Mihm M, Diskin M** (1998a): Hormonal regulation of the oestrous cycle of cattle. *Reprod. Dom. Anim.* **33**, 227-231
- Ronayne E, Enright WJ, Roche JF** (1993): Effects of continuous administration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or a potent GnRH analogue on blood luteinizing hormone and testosterone concentrations in prepubertal bulls. *Domest. Anim. Endocrinol.* **10**, 179-189
- Rose MP und Gaines-Das RE** (1996): Commentary: standardization of nonsteroidal regulators of gonadotrophin secretion. *J. Reprod. Fertil.* **107**, 151-152
- Rossmann WG, Laughlin GA, Mortola JF, Johnson ML, Veldhuis JD, Yen SSC** (1990): Pulsatile cosecretion of estradiol and progesterone by the midluteal phase corpus luteum: temporal link to luteinizing hormone pulses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 990-995
- Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA** (1999): Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrus cycle. *J. Reprod. Fertil.* **115**, 15-21
- Sandow J; von Rechenberg W; Jerzabek G, Stoll W** (1978): Pituitary gonadotropin inhibition by highly active analog of luteinizing-hormone-releasing hormone. *Fert. Steril.* **30**, 205-209
- Saunders BD, Sabbagh E, Chin WW, Kaiser UB** (1998): Differential use of signal transduction pathways in the gonadotropin-releasing hormone-mediated regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Endocrinology* **139**, 1835-1843
- Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF** (1988): Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* **83**, 663-671
- Savio JD, Boland MP, Hynes N, Mattiacci MR, Roche JF** (1990): Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7? *Theriogenology* **33**, 677-687
- Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D** (1993): Regulation of dominant follicle turnover during oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 197-203

Savoy-Moore RT, Schwartz NB, Duncan JA, Marshall JC (1980): Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* **209**, 942-944

Schallenger E (1990): Charakterisierung von Sekretionsrhythmen der Gonadotropine und Ovarsteroiden während des Brunstzyklus, der Gravidität und post partum beim Rind. *Paul Parey Scientific Publishers* Berlin und Hamburg

Schallenger E, Schondorfer AM, Walters DL (1985a): Gonadotropins and ovarian steroids in cattle I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the estrous cycle. **108**, 312-321

Schallenger E, Rampp J, Walters DL (1985b): Gonadotropins and ovarian steroids in cattle II. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout pregnancy. *Acta Endocrin.* **108**, 322-330

Schams D, Schallenger E, Hoffmann B, Karg H (1977): The oestrus cycle of the cow: hormonal parameters and time relationships concerning oestrus, ovulation and electrical resistance of vaginal mucus. *Acta Endocrin.* **86**, 180-182

Sealfon SC, Laws SC, Wu JC, Gillo B, Miller WL (1990): Hormonal regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors and messenger RNA activity in ovine pituitary culture. *Mol. Endocrinol.* **12**, 1980-1987

Silverman A-J (1988): The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry. In: Knobil E und Neill JD (Hrsg.) *The Physiology of Reproduction* Vol. 1. Raven Press, New York S. 1283-1304

Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson L, Jr. (1991): Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F_{2α} during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* **45**, 655-663

Singh J und Adams GP (1998): Immunohistochemical distribution of follistatin in dominant and subordinate follicles and the corpus luteum of cattle. *Biol. Reprod.* **59**, 561-570

Singh B, Dixit VD, Dixit VP, Lohan IS, Georgie GC (1998): Pulsatile secretory pattern of gonadotrophins and ovarian steroids during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the buffalo. *Reprod. Dom. Anim.* **33**, 363-366

Sirois J und Fortune JE (1988): Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* **39**, 308-317

Skaggs CL, Able BV, Stevenson JS (1986): Pulsatile or continuous infusion of luteinizing hormone-releasing hormone and hormonal concentrations in prepubertal beef heifers. *J. Anim. Sci.* **62**, 1034-1048

Spicer LJ und Echtenkamp SE (1986): Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* **62**, 428-451

Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ (1994): Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* **101**, 574-555

Szabo M, Kilen SM, Saberi S, Ringstrom SJ, Schwartz NB (1998): Antiprogestins suppress basal and activin-stimulated follicle-stimulating hormone secretion in an estrogen-dependent manner. *Endocrinology* **139**, 2223-2228

Thatcher WW, Drost M, Savio JD, Macmillan KL, Entwistle KW, Schmitt EJ, De la Sota RL, Morris GR (1993): New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **33**, 27-49

Thomas SG und Clarke IJ (1997): The positive feedback action of estrogen mobilizes LH-containing, but not FSH-containing secretory granules in ovine gonadotropes. *Endocrinology* **138**, 1347-1350

Tougard C (1980): Immunocytochemical identification of LH and FSH secreting cells at the light and electron microscope levels. In: Jutisz M, McKerns KW (Hrsg.) *Synthesis and Release of Adenohypophyseal Hormones* New York: Plenum 15-37

Turzillo AM, Fortune JE (1990): Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **89**, 643-653

Turzillo AM, Fortune JE (1993): Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. *J. Reprod. Fertil.* **98**, 113-119

Turzillo AM, Nolan TE, Nett TM (1998): Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene expression in sheep: Interaction of GnRH and Estradiol. *Endocrinology* **139** 4890-4894

Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ (1995a): Synchronisation of ovarian follicular wave with gonadotropin-releasing-hormone to increase the precision of estrous cycle in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* **73**, 3141-3151

Twagiramungu H, Guibault LA, Proulx JG, Dufour JJ (1995b): Buserelin alters the development of the corpora lutea in cyclic and early postpartum cows. *J. Anim. Sci.* **73**, 805-811

Ulloa-Aguirre A, Midgley AR Jr., Beitins IZ, Padmanabhan V (1995): Follicle-stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. *Endocrine Rev.* **16**, 765-787

Wathes DC und Lamming GE (1995): The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl.) **49**, 53-67

Walters DL, Schams D, Schallenberger E (1984): Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. *J. Reprod. Fertil.* **71**, 479-491

- Walters DL und Schallenberger E** (1984): Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *J. Reprod. Fertil.* **71**, 503-512
- Webb RJ, Gong JG, Law AS, Rusbridge SM** (1992): Control of ovarian function in cattle. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl.) **45**, 141-156
- Weiss J, Cote CR, Jameson JL, Crowley J WF** (1995): Homologous desensitization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-stimulated luteinizing hormone secretion in vitro occurs within the duration of an endogenous GnRH pulse. *Endocrinology* **136**, 138-143
- Wu JC, Sealfon SC, Miller WL** (1994): Gonadal hormones and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) alter messenger ribonucleic acid levels for GnRH receptors in sheep. *Endocrinology* **134**, 1846-1850
- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS** (1995): Expression of follicle-stimulating-hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* **53**, 951-957
- Yu WH, Karanth S, Walczewska A, Sower SA, McCann SM** (1997): A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* **94**, 9499-9503
- Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC** (1998): Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* **15**, 55-63
- Zelevnik AJ und Benyo DF** (1994): Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. **In:** Knobil E, Neill J (Hrsg.) *The Physiology of Reproduction* New York: Raven Press Ltd 751-781

ANHANG

Tabelle A1. Gesamtanzahl der mittels Ultraschalldiagnostik ermittelten Follikel bei Kontrolltieren mit zwei Follikelreifungswellen und Versuchstieren an den einzelnen Untersuchungstagen.

| Tag | Gesamtanzahl der Follikel (LS-Means \pm SEM) | | p-Wert |
|-----|---|----------------|--------|
| | Kontrolltiere | Versuchstiere | |
| 0 | 18,0 \pm 6,4 | 17,8 \pm 4,0 | 0,98 |
| 1 | 24,0 \pm 5,3 | 28,8 \pm 3,4 | 0,48 |
| 2* | 17,0 \pm 1,0 | 56,0 \pm 1,4 | 0,03 |
| 5 | 16,5 \pm 3,0 | 18,6 \pm 1,9 | 0,58 |
| 7 | 12,5 \pm 3,9 | 22,0 \pm 2,5 | 0,10 |
| 9 | 25,5 \pm 6,8 | 23,6 \pm 4,3 | 0,82 |
| 11 | 26,5 \pm 3,4 | 25,4 \pm 2,2 | 0,80 |
| 13 | 30,0 \pm 7,6 | 25,8 \pm 4,8 | 0,66 |
| 15 | 16,5 \pm 2,9 | 19,6 \pm 1,8 | 0,40 |
| 17 | 16,0 \pm 5,8 | 21,4 \pm 3,7 | 0,46 |
| 19 | 10,5 \pm 3,1 | 18,0 \pm 1,9 | 0,09 |
| 21 | 25,0 \pm 2,4 | 24,0 \pm 1,5 | 0,74 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A2. Anzahl der kleinen Follikel (1 bis 4 mm) bei Kontrolltieren mit zwei Follikelreifungswellen und Versuchstieren an den einzelnen Untersuchungstagen.

| Tag | Anzahl der kleinen Follikel (LS-Means \pm SEM) | | p-Wert |
|-----|---|----------------|--------|
| | Kontrolltiere | Versuchstiere | |
| 0 | 11,0 \pm 6,4 | 15,8 \pm 4,0 | 0,55 |
| 1 | 18,5 \pm 5,8 | 25,8 \pm 3,6 | 0,33 |
| 2* | 12,5 \pm 0,5 | 51,0 \pm 0,7 | 0,01 |
| 5* | 6,5 \pm 2,0 | 12,8 \pm 1,3 | 0,05 |
| 7 | 7,5 \pm 3,9 | 17,2 \pm 2,5 | 0,09 |
| 9 | 22,0 \pm 6,6 | 19,4 \pm 4,2 | 0,75 |
| 11 | 23,0 \pm 4,1 | 21,8 \pm 2,6 | 0,82 |
| 13 | 25,0 \pm 7,4 | 22,0 \pm 4,7 | 0,74 |
| 15 | 8,5 \pm 2,4 | 15,2 \pm 1,5 | 0,07 |
| 17 | 9,5 \pm 5,5 | 17,6 \pm 3,5 | 0,27 |
| 19* | 3,5 \pm 2,4 | 13,2 \pm 1,5 | 0,02 |
| 21 | 23,5 \pm 2,2 | 20,6 \pm 1,4 | 0,31 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A3. Anzahl der mittelgroßen Follikel (4 bis 8 mm) bei Kontrolltieren mit zwei Follikelreifungswellen und Versuchstieren an den einzelnen Untersuchungstagen.

| Tag | Anzahl der mittelgroßen Follikel (LS-Means \pm SEM) | | p-Wert |
|-----|--|---------------|--------|
| | Kontrolltiere | Versuchstiere | |
| 0* | 5,0 \pm 1,0 | 0,8 \pm 0,7 | 0,02 |
| 1 | 3,5 \pm 1,5 | 2,6 \pm 0,9 | 0,63 |
| 2 | 3,5 \pm 1,5 | 5,0 \pm 2,1 | 0,67 |
| 5 | 5,5 \pm 1,9 | 4,6 \pm 1,2 | 0,15 |
| 7 | 2,5 \pm 1,5 | 3,6 \pm 1,0 | 0,57 |
| 9 | 2,5 \pm 1,0 | 3,4 \pm 0,6 | 0,47 |
| 11 | 2,5 \pm 1,2 | 2,8 \pm 0,8 | 0,85 |
| 13 | 4,0 \pm 1,5 | 3,0 \pm 1,0 | 0,61 |
| 15* | 6,5 \pm 0,9 | 3,8 \pm 0,5 | 0,04 |
| 17 | 5,5 \pm 2,0 | 3,4 \pm 1,3 | 0,41 |
| 19 | 6,0 \pm 1,9 | 4,0 \pm 1,2 | 0,43 |
| 21 | 0,5 \pm 1,3 | 3,4 \pm 0,8 | 0,12 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A4. Anzahl der großen Follikel (> 8 mm) bei Kontrolltieren mit zwei Follikelreifungswellen und Versuchstieren an den einzelnen Untersuchungstagen.

| Tag | Anzahl der großen Follikel (LS-Means \pm SEM) | | p-Wert |
|-----|--|---------------|--------|
| | Kontrolltiere | Versuchstiere | |
| 0 | 2,0 \pm 0,5 | 1,2 \pm 0,3 | 0,25 |
| 1 | 2,0 \pm 0,7 | 0,4 \pm 0,5 | 0,12 |
| 2* | 1,0 \pm 0,0 | 0,0 \pm 0,0 | 0,01 |
| 5 | 1,5 \pm 0,4 | 1,2 \pm 0,3 | 0,51 |
| 7* | 2,5 \pm 0,4 | 1,2 \pm 0,3 | 0,03 |
| 9 | 1,0 \pm 0,3 | 0,8 \pm 0,2 | 0,58 |
| 11 | 1,0 \pm 0,3 | 0,8 \pm 0,2 | 0,58 |
| 13 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,00 |
| 15 | 1,5 \pm 0,4 | 0,6 \pm 0,3 | 0,12 |
| 17 | 1,0 \pm 0,3 | 0,4 \pm 0,2 | 0,20 |
| 19 | 1,0 \pm 0,3 | 0,8 \pm 0,2 | 0,58 |
| 21* | 1,0 \pm 0,0 | 0,0 \pm 0,0 | 0,01 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A5. Anzahl der LH-Pulse (Pulse pro 6 Stunden) bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel.

| Tag | Anzahl der LH-Pulse (LS-Means \pm SEM) | | | | p-Wert |
|-----|---|---------------|---------------|---------------|--------|
| | Kontrolltiere | | Versuchstiere | | |
| | | | | | |
| 1* | n = 13 | 2,2 \pm 0,5 | n = 14 | 0,7 \pm 0,4 | 0,02 |
| 2* | n = 11 | 3,0 \pm 0,5 | n = 12 | 0,9 \pm 0,5 | 0,01 |
| 3* | n = 9 | 4,6 \pm 0,5 | n = 10 | 1,0 \pm 0,5 | 0,001 |
| 4* | n = 6 | 3,8 \pm 0,8 | n = 8 | 1,4 \pm 0,7 | 0,04 |
| 5* | n = 7 | 4,1 \pm 0,6 | n = 10 | 0,9 \pm 0,5 | 0,001 |
| 11* | n = 7 | 3,3 \pm 0,4 | n = 10 | 1,4 \pm 0,4 | 0,01 |
| 15* | n = 7 | 3,7 \pm 0,5 | n = 10 | 0,8 \pm 0,4 | 0,001 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A6. Amplituden der LH-Pulse bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel.

| Tag | Amplituden der LH-Pulse in ng/ml (LS-Means ± SEM) | | | | p-Wert |
|-----|--|-------------|---------------|-------------|--------|
| | Kontrolltiere | | Versuchstiere | | |
| | | | | | |
| 1 | n = 13 | 0,20 ± 0,05 | n = 14 | 0,12 ± 0,04 | 0,26 |
| 2* | n = 11 | 0,32 ± 0,06 | n = 12 | 0,14 ± 0,06 | 0,04 |
| 3* | n = 9 | 0,44 ± 0,06 | n = 10 | 0,11 ± 0,06 | 0,01 |
| 4* | n = 6 | 0,49 ± 0,10 | n = 8 | 0,15 ± 0,08 | 0,02 |
| 5* | n = 7 | 0,51 ± 0,07 | n = 10 | 0,07 ± 0,05 | 0,001 |
| 11* | n = 7 | 0,72 ± 0,09 | n = 10 | 0,22 ± 0,08 | 0,001 |
| 15* | n = 7 | 0,72 ± 0,11 | n = 10 | 0,14 ± 0,09 | 0,001 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A7. LH-Pulsfläche bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel.

| Tag | LH-Pulsflächeneinheiten (LS-Means ± SEM) | | | | p-Wert |
|-----|---|-------------|---------------|-------------|--------|
| | Kontrolltiere | | Versuchstiere | | |
| | | | | | |
| 1* | n = 13 | 0,04 ± 0,01 | n = 14 | 0,02 ± 0,01 | 0,02 |
| 2* | n = 11 | 0,09 ± 0,02 | n = 12 | 0,02 ± 0,01 | 0,01 |
| 3* | n = 9 | 0,14 ± 0,02 | n = 10 | 0,02 ± 0,01 | 0,001 |
| 4* | n = 6 | 0,20 ± 0,03 | n = 8 | 0,03 ± 0,03 | 0,01 |
| 5* | n = 7 | 0,22 ± 0,04 | n = 10 | 0,01 ± 0,04 | 0,01 |
| 11* | n = 7 | 0,33 ± 0,04 | n = 10 | 0,04 ± 0,04 | 0,001 |
| 15* | n = 7 | 0,33 ± 0,06 | n = 10 | 0,06 ± 0,05 | 0,01 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A8. LH-Basalniveau bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 1 bis 5, 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel.

| Tag | LH-Basalniveau in ng/ml (LS-Means ± SEM) | | | | p-Wert |
|-----|---|-------------|---------------|-------------|--------|
| | Kontrolltiere | | Versuchstiere | | |
| | | | | | |
| 1* | n = 13 | 0,68 ± 0,11 | n = 14 | 0,98 ± 0,09 | 0,04 |
| 2* | n = 11 | 0,65 ± 0,11 | n = 12 | 1,17 ± 0,11 | 0,01 |
| 3* | n = 9 | 0,74 ± 0,14 | n = 10 | 1,15 ± 0,13 | 0,04 |
| 4 | n = 6 | 0,69 ± 0,15 | n = 8 | 0,97 ± 0,13 | 0,19 |
| 5 | n = 7 | 0,60 ± 0,13 | n = 10 | 0,95 ± 0,11 | 0,06 |
| 11 | n = 7 | 0,47 ± 0,09 | n = 10 | 0,71 ± 0,08 | 0,07 |
| 15 | n = 7 | 0,59 ± 0,09 | n = 10 | 0,73 ± 0,08 | 0,26 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A9. FSH-Pulsanzahl (Pulse pro 6 Stunden) bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 0 bis 5, sowie 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel.

| Tage 0 bis 5, sowie 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl Depot-Lösungsmittel: | | | | | |
|--|--|-------------|---------------|-------------|--------|
| Tag | Anzahl der FSH-Pulse (LS-Means ± SEM) | | | | p-Wert |
| | Kontrolltiere | | Versuchstiere | | |
| 0* | n = 7 | 5,00 ± 0,87 | n = 14 | 2,24 ± 0,61 | 0,03 |
| 1 | n = 7 | 3,57 ± 0,95 | n = 9 | 3,22 ± 0,84 | 0,79 |
| 2 | n = 6 | 4,17 ± 1,13 | n = 8 | 4,00 ± 0,98 | 0,91 |
| 3 | n = 5 | 4,60 ± 1,01 | n = 7 | 3,28 ± 0,85 | 0,34 |
| 4 | n = 3 | 2,33 ± 1,06 | n = 6 | 2,17 ± 0,75 | 0,90 |
| 5 | n = 5 | 2,00 ± 0,40 | n = 7 | 2,00 ± 0,34 | 1,00 |
| 11 | n = 5 | 2,40 ± 0,55 | n = 7 | 2,00 ± 0,47 | 0,59 |
| 15 | n = 5 | 2,20 ± 0,67 | n = 7 | 1,57 ± 0,57 | 0,49 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A10. FSH-Pulsamplitude (ng/ml) der Kontroll- und Versuchstiere an den Tagen 0 bis 5, 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel.

| Tag | Amplituden der FSH-Pulse in ng/ml (LS-Means ± SEM) | | | | p-Wert |
|-----|---|-------------|---------------|-------------|--------|
| | Kontrolltiere | | Versuchstiere | | |
| | | | | | |
| 0 | n = 7 | 0,82 ± 0,53 | n = 14 | 1,36 ± 0,38 | 0,42 |
| 1 | n = 7 | 0,48 ± 0,14 | n = 9 | 0,49 ± 0,12 | 0,98 |
| 2 | n = 6 | 0,74 ± 0,25 | n = 8 | 0,88 ± 0,22 | 0,67 |
| 3 | n = 5 | 0,71 ± 0,20 | n = 7 | 0,68 ± 0,17 | 0,91 |
| 4* | n = 3 | 0,60 ± 0,12 | n = 6 | 0,22 ± 0,08 | 0,04 |
| 5 | n = 5 | 0,75 ± 0,18 | n = 7 | 0,78 ± 0,15 | 0,91 |
| 11 | n = 5 | 0,85 ± 0,37 | n = 7 | 1,31 ± 0,32 | 0,37 |
| 15 | n = 5 | 0,55 ± 0,35 | n = 7 | 0,93 ± 0,29 | 0,42 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A11. FSH-Pulsfläche (Flächeneinheiten) der Kontroll- und Versuchstiere an den Tagen 0 bis 5, 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel.

| Tag | FSH-Pulsflächeneinheiten (LS-Means ± SEM) | | | | p-Wert |
|-----|--|-------------|---------------|-------------|--------|
| | Kontrolltiere | | Versuchstiere | | |
| 0 | n = 7 | 0,26 ± 0,42 | n = 14 | 0,79 ± 0,30 | 0,33 |
| 1 | n = 7 | 0,16 ± 0,06 | n = 9 | 0,18 ± 0,05 | 0,82 |
| 2 | n = 6 | 0,24 ± 0,09 | n = 8 | 0,23 ± 0,08 | 0,89 |
| 3 | n = 5 | 0,14 ± 0,06 | n = 7 | 0,22 ± 0,05 | 0,35 |
| 4 | n = 3 | 0,13 ± 0,03 | n = 6 | 0,04 ± 0,02 | 0,06 |
| 5 | n = 5 | 0,12 ± 0,07 | n = 7 | 0,18 ± 0,06 | 0,48 |
| 11 | n = 5 | 0,23 ± 0,12 | n = 7 | 0,41 ± 0,10 | 0,26 |
| 15 | n = 5 | 0,17 ± 0,13 | n = 7 | 0,29 ± 0,11 | 0,49 |

Tabelle A12. FSH-Basalniveau (ng/ml) bei Kontroll- und Versuchstieren an den Tagen 0 bis 5, 11 und 15 nach der Applikation von Decapeptyl® Depot/Lösungsmittel.

| Tag | FSH-Basalniveau in ng/ml (LS-Means ± SEM) | | | | p-Wert |
|-----|--|-------------|---------------|-------------|--------|
| | Kontrolltiere | | Versuchstiere | | |
| 0* | n = 7 | 1,26 ± 0,64 | n = 14 | 2,93 ± 0,45 | 0,05 |
| 1 | n = 7 | 1,64 ± 0,27 | n = 9 | 1,66 ± 0,24 | 0,95 |
| 2 | n = 6 | 1,63 ± 0,35 | n = 8 | 1,96 ± 0,31 | 0,50 |
| 3 | n = 5 | 1,62 ± 0,40 | n = 7 | 1,87 ± 0,34 | 0,65 |
| 4 | n = 3 | 1,29 ± 0,42 | n = 6 | 1,50 ± 0,30 | 0,69 |
| 5 | n = 5 | 1,36 ± 0,27 | n = 7 | 1,44 ± 0,22 | 0,83 |
| 11 | n = 5 | 1,63 ± 0,41 | n = 7 | 1,79 ± 0,35 | 0,76 |
| 15 | n = 5 | 1,31 ± 0,36 | n = 7 | 1,79 ± 0,31 | 0,33 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A13. Progesteronkonzentration bei Kontroll- und Versuchstieren (n = 10 V; n = 7 K) an den einzelnen Untersuchungstagen.

| Tag | Progesteron in ng/ml (LS-Means \pm SEM) | | p-Wert |
|-----|--|-----------------|--------|
| | Kontrolltiere | Versuchstiere | |
| 0* | 0,58 \pm 0,03 | 0,43 \pm 0,03 | 0,01 |
| 1* | 0,52 \pm 0,04 | 0,41 \pm 0,03 | 0,04 |
| 2 | 0,49 \pm 0,04 | 0,42 \pm 0,34 | 0,21 |
| 3 | 0,76 \pm 0,10 | 0,72 \pm 0,09 | 0,81 |
| 4 | 1,10 \pm 0,19 | 1,23 \pm 0,16 | 0,62 |
| 5 | 1,64 \pm 0,26 | 1,81 \pm 0,22 | 0,63 |
| 6 | 2,17 \pm 0,32 | 2,65 \pm 0,28 | 0,29 |
| 7 | 2,68 \pm 0,42 | 3,60 \pm 0,40 | 0,13 |
| 8 | 3,26 \pm 0,48 | 4,16 \pm 0,40 | 0,17 |
| 9 | 3,69 \pm 0,56 | 4,77 \pm 0,46 | 0,15 |
| 10 | 4,08 \pm 0,49 | 5,17 \pm 0,41 | 0,11 |
| 11 | 4,35 \pm 0,68 | 5,89 \pm 0,57 | 0,11 |
| 12 | 4,76 \pm 0,64 | 5,76 \pm 0,54 | 0,25 |
| 13 | 4,85 \pm 0,72 | 5,91 \pm 0,60 | 0,27 |
| 14 | 4,81 \pm 0,64 | 5,85 \pm 0,54 | 0,23 |
| 15 | 4,73 \pm 0,64 | 5,76 \pm 0,53 | 0,23 |
| 16 | 4,59 \pm 0,59 | 5,77 \pm 0,50 | 0,15 |
| 17* | 3,40 \pm 0,80 | 5,82 \pm 0,62 | 0,03 |
| 18* | 1,99 \pm 0,91 | 5,56 \pm 0,71 | 0,01 |
| 19* | 1,61 \pm 0,79 | 4,25 \pm 0,61 | 0,02 |
| 20 | 1,22 \pm 0,80 | 2,72 \pm 0,62 | 0,16 |
| 21 | 0,97 \pm 0,85 | 1,74 \pm 0,57 | 0,47 |

Tage, an denen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) auftraten, sind durch * gekennzeichnet.

Tabelle A14. Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse (gepaarter t-Test, getrennt nach Behandlung) bezüglich des Beginns des signifikanten Abfallens der Progesteronwerte der Kontroll- und Versuchstiere am Ende des Untersuchungszeitraumes.

| Intervall | p-Wert | |
|--------------|---------------|---------------|
| | Kontrolltiere | Versuchstiere |
| Tag 16 zu 17 | 0,02* | 0,82 |
| Tag 17 zu 18 | 0,02* | 0,24 |
| Tag 18 zu 19 | 0,02* | 0,01* |
| Tag 19 zu 20 | 0,20 | 0,01* |

* kennzeichnen signifikanten ($p \leq 0,05$) Abfall der Progesteronkonzentration.

VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich, Annett Bellmann, geb. Manig, geb. am 18. 04. 1969 in Lauchhammer, wohnhaft in 18057 Rostock, An der Hasenbäk 2, dass ich die vorliegende Promotionsarbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind in der Arbeit als solche kenntlich gemacht.

Bei der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit waren keine weiteren Personen beteiligt, insbesondere habe ich auch nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Die vorgelegte Arbeit ist bisher weder ganz noch in Teilen veröffentlicht worden.

Rostock, 28.03.2001

DANKSAGUNG

Zum Schluss sei es mir gestattet, Herrn Dr. habil. W. Kanitz und Herrn Dr. F. Schneider für die Überlassung des Themas, die Betreuung während der Durchführung der Untersuchungen im FBN Dummerstorf und während der Anfertigung der Arbeit herzlich zu danken.

Herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. A. Sobiraj, dem Leiter der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die hilfreichen fachlichen Hinweise.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Herrn Dr. W. Köchling, Ferring Kiel, möchte ich für die Bereitstellung des GnRH-Agonisten danken.

Ich danke der Firma Parmacia & Upjohn, Erlangen, für die Überlassung des Pulsdetektionsprogrammes „PULSAR 2.0“.

Besonderes möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungsbereiches Fortpflanzungsbiologie des FBN Dummerstorf bedanken, die an der Durchführung der experimentellen Arbeiten beteiligt waren. Herrn Dr. F. Becker, Frau M. Spitschak und Frau R. Hantel gilt besonderer Dank für die Hilfe bei der Organisation der Versuche. Den Kolleginnen der Arbeitsgruppe Biochemie, von denen hier stellvertretend Frau U. Antkewitz, Frau P. Reckling, Frau U. Wiedemuth, Frau I. Bielawski und Frau S. Rodewald genannt werden sollen, sei herzlich für die Analysen der Blutproben gedankt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Ralf Pöhland, der stets einen guten Rat bei Problemen mit Hard- und Software hatte.

Bei Herrn Dr. G. Nürnberg aus dem Forschungsbereich Genetik und Biometrie bedanke ich mich herzlich für die umfangreiche statistische Beratung.

Meiner Familie, meinen Eltern und meinen Freunden danke ich besonders für die große Anteilnahme am Gelingen dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt meinem Mann für die Unterstützung beim Layout. Unseren Kindern sei für die vielen glücklichen Momente nach der Arbeitszeit gedankt.